

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”



DOTTORATO DI RICERCA

IN

BIOLOGIA APPLICATA

Indirizzo: Fisiologia

(XXIV ciclo)

**Caratterizzazione funzionale della proteina PII nella leguminosa
modello *Lotus japonicus***

Coordinatore

Prof. EZIO RICCA

Candidata

PARLATI AURORA

Tutor

Dott. MAURIZIO CHIURAZZI

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

Riassunto

Le proteine PII fanno parte di una grande superfamiglia di proteine che agiscono come segnali di trasduzione e che sono ampiamente distribuite in natura. Negli organismi procariotici, PII gioca un ruolo chiave come integratore dei livelli cellulari di C, N ed energia, mentre il suo ruolo è ancora poco chiaro nelle piante superiori. Recenti dati di letteratura indicano che le proteine PII sono coinvolte nel *pathway* di biosintesi dell'arginina modulando l'attività dell'N-acetil-glutammato chinasi (NAGK), mentre altri dati mostrano il suo coinvolgimento nell'assorbimento del nitrito dei cloroplasti e/o nella fine regolazione della sintesi e della composizione degli acidi grassi nei semi. In questo lavoro di tesi di Dottorato è riportata la caratterizzazione funzionale del gene *GLB1* della leguminosa modello *L. japonicus* (codificante per la proteina PII). L'analisi della localizzazione spaziale dell'attività del promotore del gene *GLB1* rivela la sua espressione nei noduli azoto-fissatori e nelle cellule di guardia degli stomi. La caratterizzazione funzionale è stata effettuata attraverso l'analisi di due linee *over-esprimenti* indipendenti. L'*over-espressione* di PII influenza la formazione dei noduli in maniera dipendente dalle concentrazioni di azoto nel mezzo di crescita che presumibilmente si riflettono in una diversa condizione nutrizionale delle piante, influenzando la loro competenza per la nodulazione. Inoltre, queste linee mostrano un'apertura stomatica costitutivamente ridotta rispetto alle *wild type*, conferendo un fenotipo di resistenza allo stress idrico. I possibili *link* metabolici di PII con i fenotipi osservati, sintesi di NO e poliammine, sono stati investigati e discussi.

Abstract

The superfamily of PII signal-transduction proteins is known to contain the most widely distributed signalling proteins in nature. PII in prokaryotic organisms is a crucial integrator of cellular carbon, nitrogen and energy levels, whereas in higher plants its role remains significantly less clear. Previous findings indicate that PII-N-acetylglutamate kinase (NAGK) complex formation controls L-arginine biosynthesis, whereas other works implicate PII in regulation of chloroplastic nitrite-uptake and/or tuning of fatty acids biosynthesis and partitioning in seeds. Here we report a functional characterization of the model legume *L. japonicus* *GLB1* gene -encoding the PII protein. The analysis of the spatial localization of the *GLB1* promoter activity revealed expression in the nitrogen fixing nodule and in the stomata cells. The functional characterization was performed through the analysis of two independent PII over-expressing lines. PII over-expression affects nodule formation capacity dependently by the N supply conditions, that presumably have influence on the general nutritional status of the plants and consequently, their competence for the nodulation process.. Moreover these lines showed a constitutive reduced aperture of stomata that conferred a hydric stress-resistant phenotype. The putative metabolic links between the PII protein and the observed phenotypes, polyamine and NO biosynthetic pathways, have been investigated and discussed.

Il lavoro di tesi di dottorato è stato svolto presso l'Istituto di Genetica e Biofisica (IGB) "Adriano Buzzati Traverso" CNR di Napoli, nel laboratorio del Dr. Maurizio Chiurazzi, al quale vanno i più vivi ringraziamenti per il supporto scientifico, lo stimolo costante e la preziosa guida. Ringrazio inoltre il Dr Alain Vavasseur del *Laboratoire des Echanges Membranaires et Signalisation*, all'*Institut de Biologie Végétale et Microbiologie Environnementales* del CNRS/CEA/Université di Marsiglia e tutti i suoi collaboratori per avermi ospitato nei suoi laboratori per una parte di questo progetto di ricerca e per avermi fatto conoscere le meraviglie di Marsiglia e di un tratto di costa azzurra. Un grosso ringraziamento va anche al prof. Sergio Esposito ed il suo staff per la disponibilità e gli esperimenti di estrazione delle poliammine. Ringrazio inoltre il personale della *Facility* di Microscopia dell'IGB e Fabio Concilio, per il sostegno tecnico sulle strumentazioni di microscopia ed informatiche. Ringrazio quindi i miei colleghi di laboratorio, che si sono succeduti nel tempo ed hanno reso indimenticabile questa esperienza; in ordine cronologico: Miriam, Giusy Giusina, Vladino Glupak, Ludovico, Francesco. Ringrazio infine tutte le persone che mi sono state vicine in questi tre anni "densi di cambiamenti e variazioni di prospettiva".

*A chi della ricerca scientifica ed interiore
ha fatto il suo scopo di vita*




“La conoscenza (da *cum-gnoscere*: apprendere - con l'intelletto, l'esperienza, i sensi, la memoria - l'essere, la ragione, il vero delle cose) è come un albero. Ancorato com'è al terreno, un albero sembra partire da terra, dal punto in cui esce. In realtà è ramificato in basso ed in alto in maniera speculare, soggetto ad una spinta simultaneamente opposta: per germogliare ha bisogno di andare dal ramo alla radice, di attingere sostanze nel buio della terra per poi condurle in alto e farne energia con l'aiuto della luce del Sole. Per crescere occorre che forza, energia e sostanze nutritive vadano avanti e indietro. Così è anche la conoscenza, con confini indefiniti ed in continua crescita. Spesso andando avanti e indietro ci si trova in altri rami, diversi da quelli che s'intendeva raggiungere. Ma è proprio questo il bello, allargare i propri percorsi interiori e trovarne di nuovi, ampliando i propri orizzonti sul mondo.”

Ed io, sono appena all'inizio..

INDICE



Capitolo 1

1. INTRODUZIONE

1.1. La superfamiglia delle proteine PII: evoluzione e conservazione	1
1.2. Importanza dell'azoto negli organismi viventi e ruolo delle proteine PII nella regolazione del rapporto C/N nelle cellule procariotiche	7
1.2.1. Uno sguardo al metabolismo dell'azoto	7
 Il processo di fissazione dell'N ₂	8
 L'ingresso dell'azoto fissato nel metabolismo cellulare	11
 La regolazione della glutammina sintetasi	13
1.2.2. Le proteine PII nei batteri non fotosintetici	15
1.2.3. Le proteine PII nei cianobatteri	26
1.3. Le proteine PII nelle piante: struttura, localizzazione e regolazione	36
1.4. Ruolo della proteina PII in pianta. Caratterizzazione fenotipica dei mutanti	48
1.4.1. Il complesso PII-NAGK ed il suo ruolo nel metabolismo aminoacidico	53
1.4.2. Ruolo di PII nella regolazione dell'assorbimento del nitrito nei cloroplasti	58
1.4.3. Ruolo di PII nella biosintesi degli acidi grassi	62
1.4.4. Ruolo tessuto-specifico di PII nei semi	69
1.5. Funzionamento degli stomi e <i>pathway</i> di <i>signalling</i> coinvolti	74
1.5.1. I movimenti dell'acqua nelle piante superiori: la traspirazione	74
1.5.2. Caratteristiche e struttura degli stomi	75
1.5.3. Il meccanismo di apertura e chiusura degli stomi	76
1.5.4. Fattori endogeni ed ambientali che influenzano il movimento stomatico	78

Capitolo 2

2. <u>SISTEMA SPERIMENTALE</u>	85
---------------------------------------	-----------

2.1. <i>Lotus japonicus</i> ed il suo partner simbiotico <i>Mesorhizobium loti</i>	85
2.2. La simbiosi azoto-fissativa: interazione mutualistica tra rizobi e leguminose	91
 Capitolo 3	
3. <u>SCOPO DEL LAVORO</u>	95
3.1. Investigazione del ruolo svolto dalla proteina PII della leguminosa modello <i>Lotus japonicus</i>	95
3.2. Possibile ruolo di PII nel controllo del corretto rapporto C/N nel processo di Simbiosi azoto-fissativa	96
3.3. Possibile ruolo di PII nella regolazione del movimento stomatico in <i>L. japonicus</i>	99
 Capitolo 4	
4. <u>MATERIALI E METODI</u>	101
4.1. Materiale biologico	101
4.2. Manipolazione di tessuto vegetale <i>in vitro</i>	101
4.2.1. Sterilizzazione dei semi di <i>Lotus japonicus</i>	101
4.2.2. Preparazione terreni di coltura e condizioni di crescita <i>in vitro</i>	102
4.2.3. Composizione dei mezzi di crescita di base	102
4.2.4. Composizione dei mezzi di crescita con svariate risorse azotate	103
4.2.5. Test di sensibilità/resistenza ad igromicina	104
4.2.6. Procedura di nodulazione <i>in vitro</i>	104
 Preparazione dei batteri	104
 Infezione delle piante con <i>M. loti</i>	105
4.3. Saggio istochimico della β -glucuronidasi	105
4.4. Estrazione della clorofilla dal tessuto vegetale	106
4.5. Preparazione delle sezioni di radice e di nodulo al vibratomo ed osservazione al microscopio ottico	106
4.6. Trasferimento <i>vitro-vivo</i> delle piante di <i>L. japonicus</i>	107
4.7. Raccolta e conservazione dei baccelli e dei semi di <i>L. japonicus</i>	107

4.8. Estrazione di acidi nucleici da pianta	107
4.8.1. Estrazione del DNA da tessuto vegetale	107
4.8.2. Estrazione dell'RNA da tessuto vegetale	108
4.9. Migrazione elettroforetica su gel di agarosio di acidi nucleici	108
4.10. Conversione dell'RNA in cDNA	109
4.11. Reazione a catena della polimerasi (PCR)	109
4.12. PCR semi-quantitativa utilizzando come stampo il cDNA	110
4.13. Preparazione degli epidermidi fogliari ed analisi del grado di apertura stomatica nelle foglie di <i>L. japonicus</i>	112
4.14. Analisi del tasso di traspirazione	112
4.15. Analisi di valutazione del <i>Ratio Water Content</i> (RWC)	113
4.16. Preparazione degli estratti vegetali per la misurazione dei livelli di poliammine mediante HPLC	113
4.17. Preparazione degli estratti proteici e valutazione della concentrazione proteica mediante il metodo di Bradford	114
4.18. Saggio della nitrato reductasi	115
 Capitolo 5	
5. <u>RISULTATI</u>	117
5.1. Ottenimento delle piante omozigoti trasformate con <i>pCAMBIA-prGLB1:gusA</i> o <i>pCAMBIA-pr35S-GLB1</i>	117
5.2. Analisi di qRT-PCR delle piante segreganti omozigoti ottenute	120
5.3. Analisi del profilo spaziale di attività del promotore del gene <i>LjGLB1</i>	122
5.4. Indagini sul ruolo della proteina PII nella nodulazione in <i>L. japonicus</i>	126
5.4.1. Analisi del fenotipo di nodulazione nelle piante <i>PII-over</i> A.9.6 in condizioni permissive per la simbiosi azoto-fissativa	127
5.4.2. Analisi del fenotipo di nodulazione in piante <i>wild type</i> e <i>PII-over</i> A.9.6 pre-incubate in alto azoto	130

5.5. Analisi del livello delle poliammine in piante <i>wild type</i> e <i>PII-over</i> A.9.6	133
5.6. Ruolo della proteina PII di <i>L. japonicus</i> nel meccanismo di apertura/chiusura degli stomi	137
5.7. Ruolo di PII nella regolazione della traspirazione e nella risposta allo stress idrico in piante di <i>L. japonicus</i>	139
5.7.1. Analisi del tasso di traspirazione nelle piante <i>over-esprimenti</i>	139
5.7.2. Valutazione del <i>Ratio Water Content</i> (RWC)	140
5.7.3. <i>Time course</i> del profilo di espressione di <i>GLB1</i> durante condizioni di stress idrico indotto	142
5.8. Coinvolgimento della proteina PII di <i>L. japonicus</i> nella regolazione dell'attività dell'enzima nitrato reductasi	143
5.9. Analisi dell'effetto della sensibilità al nitrito delle piante <i>over-esprimenti</i> il gene <i>GLB1</i> in <i>L. japonicus</i>	145
 Capitolo 6	
6. DISCUSSIONE	147
 ▪ Bibliografia	164
▪ Elenco delle abbreviazioni	173

1. INTRODUZIONE

1.1 La superfamiglia delle proteine PII: evoluzione e conservazione

Le proteine PII fanno parte di una grande superfamiglia di proteine che agiscono come segnali di trasduzione e che sono ampiamente distribuite in natura [Forchhammer 2004]. La grande diffusione delle tecniche di sequenziamento genomico ha permesso di rivelare che sono stati ritrovati membri di questa famiglia ubiquitari tra i procarioti. Inoltre è stato visto che alcuni rappresentanti di questa famiglia sono distribuiti in tutti i domini della vita, essendo stati ritrovati in organismi semplici quali gli archeobatteri azoto-fissatori ed in organismi sempre più complessi come nei cloroplasti di eucarioti fototrofi [Arcondéguy *et al.* 2001; Forchhammer 2008].

Le proteine PII sono state studiate a lungo negli ultimi anni perché è diventato sempre più evidente che esse giochino un ruolo fondamentale nel metabolismo dell'azoto nelle cellule batteriche.

La notevole versatilità funzionale di queste proteine ha permesso loro di partecipare ad un'ampia gamma di *pathway* metabolici coinvolti nella regolazione e nel controllo dell'azoto attraverso l'interazione con numerosi *target* cellulari [Forchhammer 2008].

L'ancestore di PII è *glnB* di *E. coli*, che è stato scoperto circa 40 anni fa. Un paralogo di PII, *glnK*, che ha una struttura quasi identica a *glnB* è stato scoperto nel 1990 [Forchhammer 2008; Xu *et al.* 1998]. La caratteristica dei geni *glnK* è la loro associazione trascrizionale con *amtB*, che codifica per un trasportatore dell'ammonio. Questa associazione sembra essere conservata in tutti i procarioti indicando anche un ruolo funzionale; infatti è stato scoperto che GlnK lega AmtB provocando un'inibizione della sua attività. Allo stesso modo, la maggior parte dei geni *glnB* descritti sono associati a *glnA*, che codifica per la glutamina sintetasi (GS) o a *nadE*, che codifica per una NAD⁺ sintetasi [Arcondeguy *et al.* 2001].

Arcondeguy e collaboratori nel 2001 hanno proposto una nomenclatura per le proteine PII nel tentativo di creare una classificazione razionale per raggruppare e descrivere i membri di questa superfamiglia, anche per rimediare alla confusa

situazione che si era venuta a creare con il tempo a causa della caratterizzazione crescente di nuovi ortologhi di PII.

Sono stati proposti tre sottogruppi principali che sono *glnB*, *glnK* e *nifl*, sulla base di due criteri distinti: la conservazione dell'associazione genica e la sequenza aminoacidica delle proteine.

Il sottogruppo *glnB* comprende quei geni strettamente correlati che, con poche eccezioni, producono mRNA monocistronici o sono geni associati a *glnA* o *nadE*.

Il sottogruppo *glnK* comprende invece tutti quei geni PII associati ad *amtB*, come precedentemente adottato. Sono state incluse anche alcune eccezioni, come per il gene *glnZ* di *Azospirillum brasilense*, che mostra un'elevata similarità di sequenza rispetto al gene *glnK*, ma non è associato ad alcun gene *amtB*.

Infine, il terzo sottogruppo comprende i geni *nifl* che sono associati all'operone della nitrogenasi. Questo gruppo abbastanza distante geneticamente dagli altri due gruppi comprende esclusivamente proteine PII di archeobatteri azoto-fissatori e di alcuni batteri anaerobici; inoltre sembra che queste proteine siano coinvolte nel processo di fissazione dell'azoto [Dodsworth e Leigh 2007].

Tuttavia successivamente è stato visto che alcuni geni codificanti proteine PII-like, non erano in accordo con questo sistema di classificazione. Nel 2009 Sant'Anna e collaboratori hanno rivisitato questo sistema di classificazione attraverso un'approfondita analisi degli omologhi di PII depositati in *GenBank*, ponendo l'attenzione anche agli aspetti evolutivi di questa superfamiglia di proteine [Sant'Anna *et al.* 2009].

Analizzando la sequenza aminoacidica delle proteine PII hanno aggiunto un ulteriore gruppo definito PII-NG (*PII New Group*), che comprende tutte le proteine che non consentivano l'allineamento della loro sequenza con nessuna delle proteine inserite nei primi gruppi considerati da Arondeguy e collaboratori (Fig. 1).

Inoltre hanno disegnato, mediante l'aiuto di strumenti bioinformatici, un albero filogenetico comprendente numerose proteine PII rappresentanti una buona diversità tassonomica e numerosi paraloghi. Quest'analisi filogenetica ha mostrato che le proteine PII possono essere suddivise in 7 gruppi principali (Fig. 2).

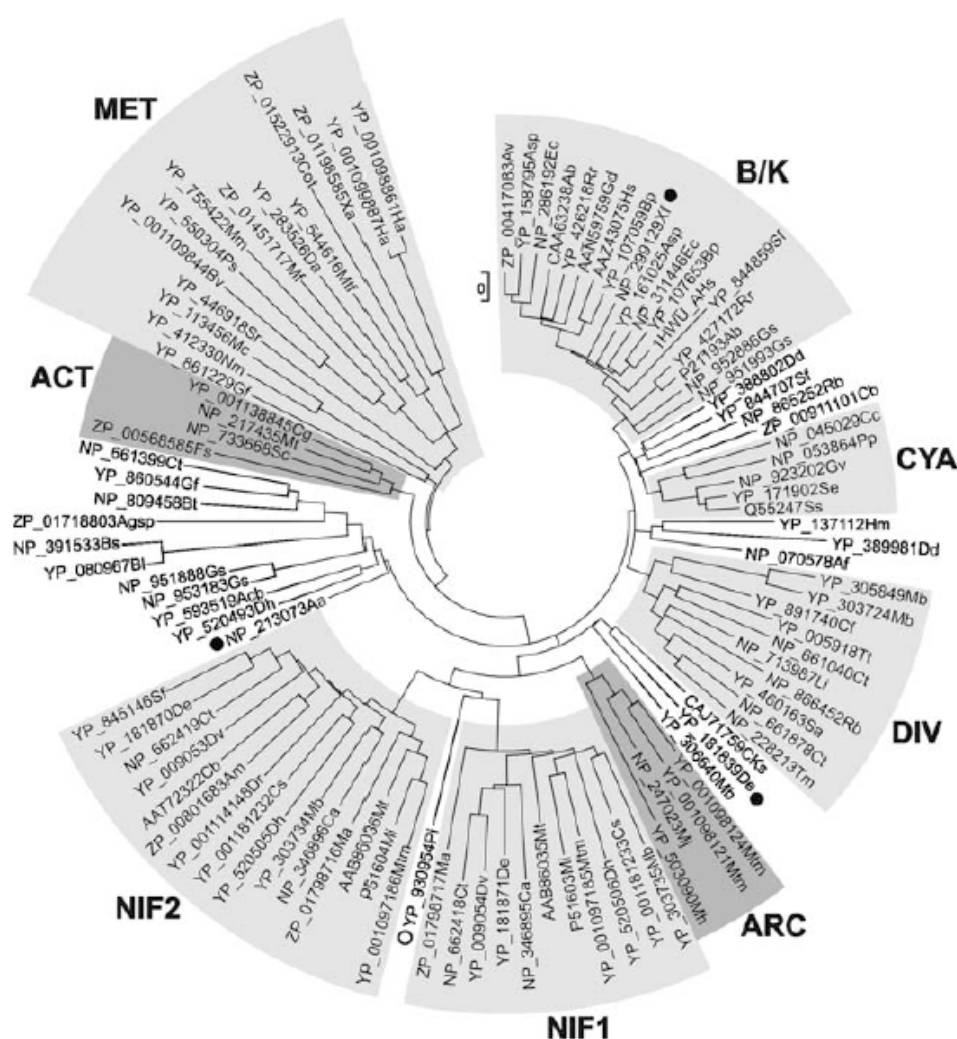


Figura 2: Albero filogenetico che rappresenta le relazioni evolutive delle proteine PII in differenti organismi procarioti ed eucarioti. La ricostruzione filogenetica è stata ottenuta mediante il metodo *Neighbor-joining*. Da Sant'Anna *et al.* 2009.

Il gruppo MET comprende proteine PII di Proteobatteri i cui geni codificanti sono associati a geni coinvolti nel trasporto di metalli pesanti; il gruppo ACT comprende GlnK di Actinobatteri; il gruppo NIF include Nif1/Nif2 di diverse specie di procarioti; il gruppo ARC contiene GlnK da Archeobatteri; il gruppo DIV comprende GlnK da diverse specie procariotiche; il gruppo B/K contiene principalmente GlnB/GlnK di Proteobatteri; infine il gruppo CYA, di notevole interesse, include proteine PII di Cianobatteri e Piante. A differenza di quanto avviene nei batteri, nei genomi dei Cianobatteri attualmente disponibili, salvo rare eccezioni, è stato trovato solo un singolo gene che codifica per la proteina PII. Nelle alghe rosse il gene PII è stato mappato nel genoma plastidiale, mentre nella pianta modello *Arabidopsis thaliana*, il gene PII è localizzato nel genoma nucleare ed è stato visto che la proteina è

successivamente trasportata nei plastidi. Sembra che la presenza della proteina PII nelle cellule eucariotiche vegetali sia la conseguenza del fenomeno di endosimbiosi, in cui un Cianobatterio è stato integrato in una cellula eucariotica ancestrale, generando un organello cloroplastidico [Osanai e Tanaka 2007; Raven e Allen 2003].

L'associazione genica tra le proteine AmtB e GlnK è considerata una delle più antiche nella storia della biologia [Thomas *et al.* 2000]. Thomas e collaboratori ipotizzano che i geni *amtB* e *glnK* fossero associati prima della divergenza di Archeobatteri ed Eubatteri come suggerisce il fatto che oggi questi geni sono associati e presenti in entrambi i domini. Questo però solleva un'importante questione: se *glnK* e *amtB* derivano dall'LCA (*Last Common Ancestor*, ultimo comune antenore) dei tre domini della vita, perché gli eucarioti sono privi del gene PII? I geni PII delle piante infatti non possono essere considerati veri omologhi di PII eucariotici a causa della loro probabile acquisizione dai Cianobatteri per endosimbiosi [Osanai e Tanaka 2007]. Una possibile spiegazione per la perdita degli omologhi PII nella linea di discendenza degli eucarioti potrebbe essere dovuta al fatto che il gene PII si sia originato nei procarioti e sia stato trasferito mediante HGT (*Horizontal Gene Transfer*, trasferimento genico orizzontale) tra gli Eubatteri e gli Archeobatteri.

In un processo normale di riproduzione, che ovviamente si verifica tra individui della stessa specie, i geni vengono trasferiti dai genitori ai discendenti mediante le cellule germinali. Questo processo, recentemente, viene indicato anche come trasferimento genico verticale, per distinguerlo dal trasferimento genico orizzontale (HGT) che indica, invece, il trasferimento di materiale genetico tra individui appartenenti alla stessa specie o a specie diverse, attraverso processi diversi dalla normale riproduzione. Normalmente l'HGT avviene tra organismi procarioti che si scambiano tra loro dei geni, superando le barriere naturali esistenti tra le specie. I processi di HGT sono tre: la coniugazione, la trasduzione e la trasformazione [Gogarten e Townsend 2005].

Recentemente Peng e collaboratori hanno ipotizzato che i geni *amtB* si siano originati dagli Archeobatteri e siano stati successivamente trasferiti agli Eubatteri attraverso un processo di HGT [Peng e Huang 2006]. Poiché l'associazione dei geni *glnK* e *amtB* è quasi ubiquitaria tra i procarioti, l'ipotesi più sensata da un punto di vista evolutivo è che i geni *PII* condividano la stessa origine evolutiva dei geni *amtB*.

Sant'Anna e collaboratori hanno proposto nel 2009 un modello schematico dell'evoluzione dei geni *PII* con i probabili eventi genetici che spiegherebbero l'attuale distribuzione di questi geni nei tre domini della vita (Fig. 3). Secondo questo modello, i geni *amtB* e *glnK* si sono originati nei Procarioti, molto probabilmente negli Archeobatteri e si sono diffusi, agli Eubatteri mediante HGT ed ai vari bracci di discendenza procariotici mediante un comune meccanismo di trasferimento genico verticale. Questo spiegherebbe la quasi ubiquitaria presenza di PII nei Procarioti e la sua assenza negli Eucarioti, eccezion fatta per le piante a causa dell'endosimbiosi. Infine il gene *glnB* deriverebbe da una duplicazione genica in un antenore dei Proteobatteri che conteneva il contesto genetico *glnA-PII-amtB*.

Complessivamente queste ipotesi suggeriscono che l'HGT ha giocato un ruolo chiave nell'evoluzione di PII, corroborando diversi studi recenti che indicano che il livello di HGT tra gli organismi potrebbe essere sottostimato e che l'HGT potrebbe avere un ruolo più importante nell'evoluzione dei genomi dei procarioti [Brown 2003].

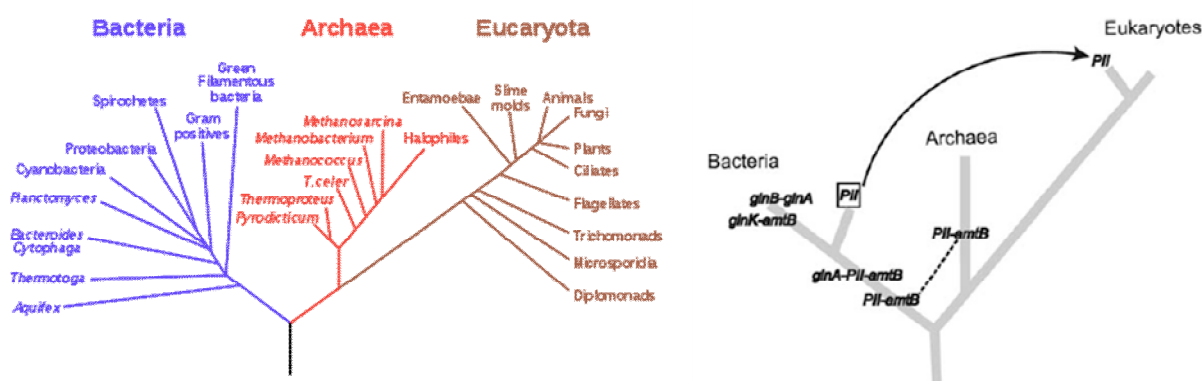


Figura 3: (A) Classificazione biologica della vita introdotta da Carl Woese nel 1990 che divide la vita cellulare in tre domini: *Archea*, *Bacteria* ed *Eucaryota*. In particolare è enfatizzata la separazione dei procarioti in due gruppi originariamente chiamati *Archaeobacteria* (attualmente *Archea*) ed *Eubacteria* (attualmente *Bacteria*) sulla base delle differenze delle sequenze degli rRNA 16S [Woese *et al.* 1990]. Da Woese *et al.* 1990. (B) Rappresentazione schematica dell'evoluzione dei geni PII lungo l'albero della vita. In questo modello i geni *glnK* e *amtB* sarebbero derivati dai procarioti primitivi e successivamente trasferiti mediante un evento di trasferimento genico orizzontale (HGT) agli altri procarioti (la linea tratteggiata indica questo trasferimento genico orizzontale). I geni *glnB* e *glnK* deriverebbero da un evento di duplicazione genica avvenuto prima dell'origine dei Proteobatteri. La proteina PII dei Cianobatteri (evidenziata con un quadratino) sarebbe stata acquisita dagli eucarioti (piante) attraverso un evento di endosimbiosi (freccia nera). Da Sant'Anna *et al.* 2009.

1.2 Importanza dell'azoto negli organismi viventi e ruolo delle proteine PII nella regolazione del rapporto C/N nelle cellule procariotiche

1.2.1 Uno sguardo al metabolismo dell'azoto

Dopo carbonio, idrogeno ed ossigeno, l'elemento più abbondante negli organismi viventi è l'azoto, un elemento fondamentale in quanto è il costituente di numerosissime molecole di interesse biochimico: proteine, acidi nucleici, fitormoni, coenzimi, pigmenti, amminozuccheri, poliammine e molte altre.

La forma più abbondante di azoto è quella presente nell'aria, che per quattro quinti è azoto molecolare (N_2). Tuttavia, soltanto un numero relativamente piccolo di specie può convertire l'azoto atmosferico in forme utili per gli organismi viventi. I processi metabolici di organismi diversi operano in modo interdependente per convertire e riutilizzare l'azoto disponibile per i processi biologici in altre forme creando quello che viene definito Ciclo dell'Azoto (Fig. 4). La prima tappa del ciclo dell'azoto è la **fissazione**, un processo di riduzione dell'azoto atmosferico da parte dei batteri azoto-fissatori per formare ammoniaca (NH_3 o NH_4^+). Anche se l'ammoniaca potrebbe essere utilizzata dalla maggior parte degli organismi viventi, i batteri del suolo che ottengono l'energia di cui hanno bisogno ossidando l'ammoniaca a nitrito (NO_2^-) e successivamente a nitrato (NO_3^-), sono così abbondanti che praticamente tutta l'ammoniaca prodotta nel suolo viene trasformata in nitrato, nel processo noto come **nitrificazione**. A questo punto le piante e molti batteri possono facilmente assumere e ridurre il nitrato ed il nitrito ad opera della nitrato reduttasi (NR) e della nitrito reduttasi (NiR). In particolare, le piante riducono il nitrato a nitrito nel citoplasma (NR), trasportano il nitrito nei cloroplasti, dove viene ridotto ulteriormente ad ammonio (NiR). L'ammoniaca così formata può essere inserita negli amminoacidi delle piante e successivamente in altre biomolecole azotate. Gli animali utilizzano poi le piante come fonte di amminoacidi essenziali e non essenziali per la produzione delle proteine. Quando un organismo muore, la degradazione microbica delle sue proteine fa tornare l'ammoniaca nel suolo, dove viene convertita in nitriti e nitrati dai batteri del suolo che mantengono un bilancio tra azoto fissato ed azoto atmosferico convertendo il nitrato ad N_2 in condizioni anaerobiche, in un processo chiamato **denitrificazione**.

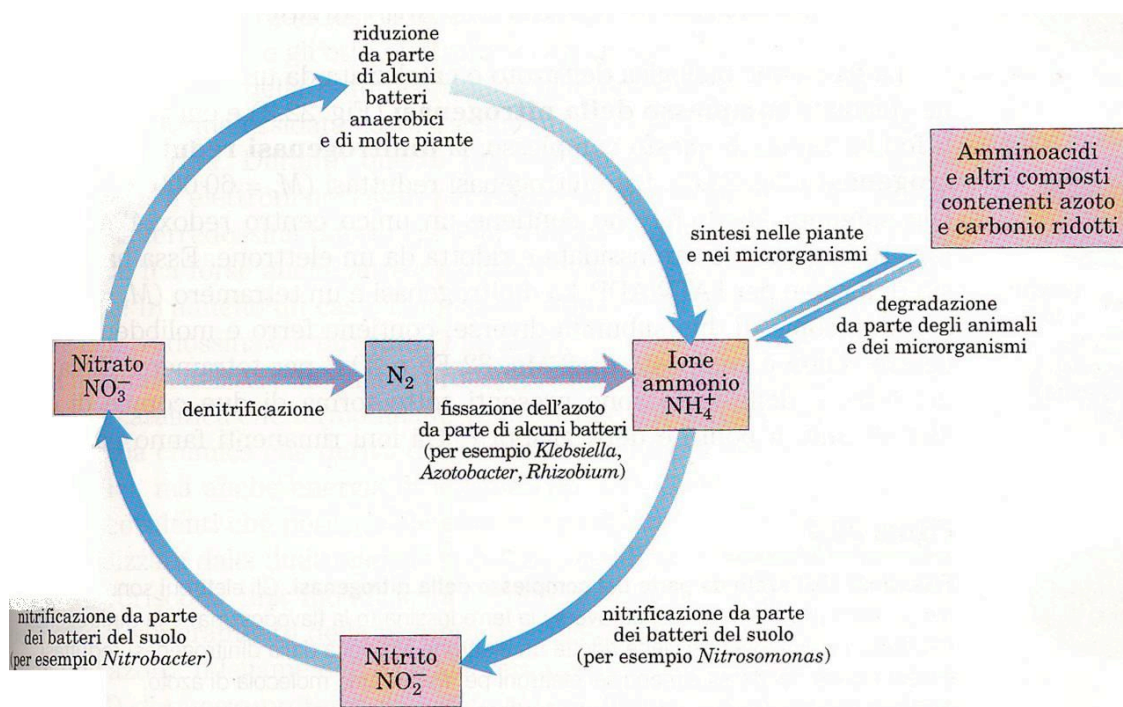
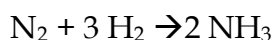


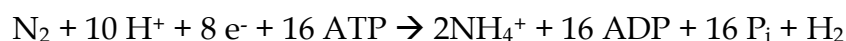
Figura 4: Rappresentazione schematica del Ciclo dell'azoto. La quantità totale di azoto fissata annualmente nella biosfera supera i 10^{11} kg. Da Nelson e Cox 2002.

• Il processo di fissazione dell'azoto

Soltanto alcuni microrganismi possono fissare l'azoto atmosferico. Tra questi vi sono Cianobatteri, che vivono nel suolo e nelle acque dolci e salate, altri tipi di batteri del suolo, come le specie del genere *Azotobacter*, ed i batteri che fissano l'azoto e che vivono come simbionti nei noduli delle radici delle piante leguminose. Il primo importante prodotto della fissazione dell'azoto in tutti questi organismi è l'ammoniaca, che può essere usata da altri organismi sia direttamente sia dopo trasformazione in altri prodotti solubili come i nitriti, i nitrati oppure gli amminoacidi. La riduzione dell'azoto ad ammoniaca è una reazione esoergonica:



Il triplo legame $\text{N}\equiv\text{N}$ è molto stabile, la fissazione dell'azoto ha quindi un'energia di attivazione molto elevata e l'azoto atmosferico è praticamente inerte nelle condizioni normali. La barriera di attivazione viene superata, almeno in parte, dal legame e dall'idrolisi dell'ATP. La reazione complessiva è:



La fissazione biologica dell'azoto è catalizzata da un complesso di proteine chiamato complesso della nitrogenasi e dai due componenti fondamentali di questo complesso: la dinitrogenasi e la dinitrogenasi (Fig. 5). La dinitrogenasi riduttasi (codificata dal gene *nifH*) è un dimero con subunità identiche e può essere ossidata e ridotta da un elettrone; inoltre ha due siti di legame per l'ATP/ADP. La dinitrogenasi è un tetramero con due copie di due subunità diverse. La fissazione dell'azoto è portata avanti da una forma di dinitrogenasi altamente ridotta e richiede otto elettroni: sei per la riduzione dell' N_2 e due per produrre una molecola di H_2 come parte obbligata del meccanismo di reazione.

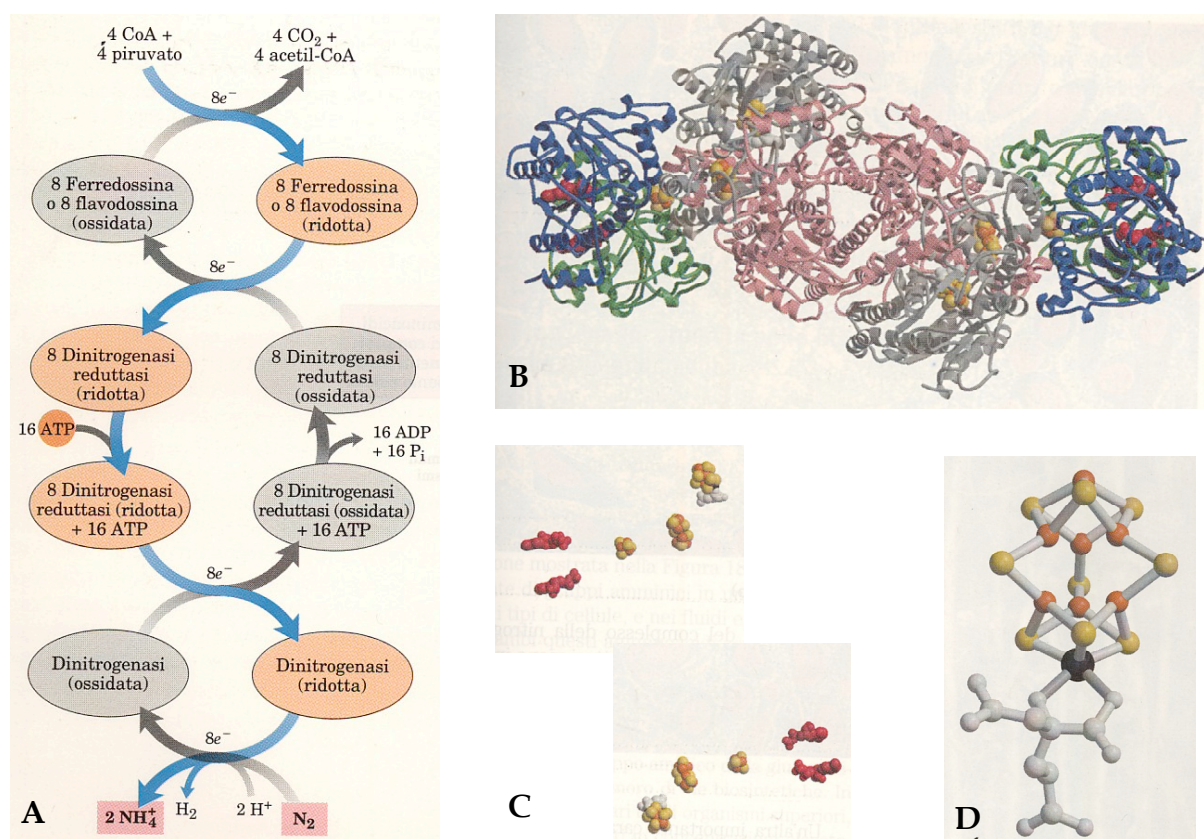


Figura 5: Fissazione dell'azoto da parte del complesso della nitrogenasi. (A) sequenza di reazioni in cui gli elettroni sono trasportati dal piruvato alla dinitrogenasi attraverso la ferredossina e la dinitrogenasi riduttasi. La dinitrogenasi viene ridotta un elettrone alla volta dalla dinitrogenasi riduttasi e deve essere ridotta ad almeno sei elettroni per fissare una molecola di azoto. Altri due elettroni (per un totale di otto elettroni per una molecola di azoto) sono necessari per ridurre due H⁺ a H₂, un processo che accompagna obbligatoriamente la fissazione dell'azoto negli organismi anaerobici. (B) Rappresentazione a nastro del complesso della nitrogenasi. Le subunità della dinitrogenasi sono mostrate in grigio e in rosa, quelle della dinitrogenasi riduttasi in blu e verde. L'ADP legato è indicato in rosso. È possibile riconoscere il complesso 4Fe-4S (i cui atomi di ferro e di zolfo sono rispettivamente in arancione e in giallo) ed il cofattore Fe-Mo (il molibdeno è in nero e l'omocitrato in grigio chiaro). (C) Rappresentazione dei cofattori del complesso della nitrogenasi senza la proteina. (D) Rappresentazione del cofattore Fe-Mo. Da Nelson e Cox 2002.

La dinitrogenasi viene ridotta dal trasferimento di elettroni da parte della dinitrogenasi riduttasi. La dinitrogenasi ha due siti di legame per la reduttasi e gli otto elettroni necessari sono trasferiti tutti in una sola volta; durante questo processo la reduttasi idrolizza ATP. La fonte di elettroni necessari per ridurre la dinitrogenasi riduttasi in genere arriva dalla ferredossina ridotta che a sua volta utilizza gli elettroni che arrivano dal piruvato.

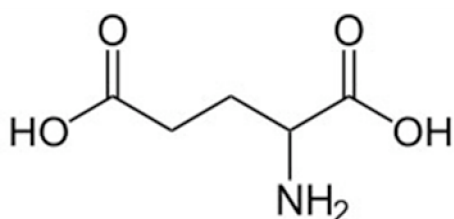
Un'importante caratteristica del complesso della nitrogenasi è la sua estrema labilità in presenza di ossigeno; i batteri che vivono liberi e fissano l'azoto evitano o risolvono questo problema in diversi modi. Alcuni sintetizzano la nitrogenasi solo in condizioni anaerobiche, oppure ne reprimono la sintesi in presenza di ossigeno. I batteri aerobici, come *Azotobacter vinelandii*, disaccoppiano parzialmente il trasporto degli elettroni dalla sintesi di ATP, in modo che l'ossigeno venga bruciato alla stessa velocità con cui entra nella cellula. I cianobatteri filamentosi che fissano l'azoto utilizzano una soluzione diversa: una cellula ogni nove diventa un'eterocisti, una cellula specializzata per la fissazione dell'azoto, con pareti molto spesse per impedire l'ingresso di ossigeno. Le relazioni simbiotiche tra le specie leguminose ed i batteri che fissano l'azoto presenti nei noduli delle radici risolvono i problemi inerenti sia alle necessità energetiche della relazione, sia alla labilità degli enzimi all'ossigeno. La richiesta di energia per la fissazione dell'azoto è stata probabilmente il motivo determinante per cui l'evoluzione ha favorito l'associazione delle piante con i batteri. I batteri presenti nei noduli delle radici hanno accesso a una grande riserva di energia sotto forma di carboidrati e di intermedi del ciclo dell'acido citrico resi disponibili dalla pianta. Grazie alla disponibilità di questa fonte energetica, i batteri dei noduli delle radici possono fissare l'azoto ad una velocità centinaia di volte più elevata di quella dei batteri che vivono liberi nelle condizioni che si incontrano nel suolo. Per risolvere il problema della tossicità dell'ossigeno, i batteri dei noduli delle radici sono immersi in una soluzione di una proteina che lega l'ossigeno, chiamata leghemoglobina, prodotta dalla pianta (il gruppo eme può essere fornito dai batteri). La leghemoglobina lega tutto l'ossigeno impedendo che vada ad interferire con il complesso della nitrogenasi e lo trasporta al sistema di trasporto degli elettroni del batterio [Nelson e Cox 2002]. L'efficienza della simbiosi tra piante e batteri è evidente anche dall'arricchimento in azoto che si ha nel suolo in cui crescono piante

leguminose. Questo fenomeno è alla base dei due metodi agronomici utilizzati per arricchire in azoto terreni che ne sono privi o carenti:

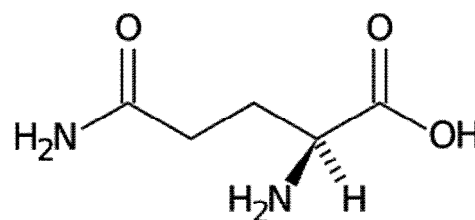
1. Rotazione delle coltivazioni: in cui alle piante che sottraggono azoto al terreno (come i cereali), vengono alternate coltivazioni di leguminose come i piselli, l'erba medica ed il trifoglio;
2. Sovescio: pratica agronomica consistente nell'interramento di apposite colture di leguminose allo scopo di mantenere od aumentare la fertilità del terreno.

• L'ingresso dell'azoto fissato nel metabolismo cellulare

L'azoto ridotto è assimilato ed incorporato sottoforma di NH_4^+ dapprima nelle molecole di amminoacidi ed in seguito, in altre biomolecole azotate. Il punto di ingresso dell'azoto in questo processo è rappresentato da due amminoacidi: glutammina (Gln, Q) e glutammato (Glu, E).



Glutammato
Glu (E)



Glutammina
Gln (Q)

Questi due amminoacidi svolgono una funzione essenziale anche nel catabolismo degli amminoacidi, infatti la maggior parte dei gruppi amminici degli amminoacidi derivano dal glutammato attraverso reazioni di transamminazione, mentre il gruppo amidico della glutammina è la fonte di gruppi amminici in diverse vie biosintetiche. Le vie biosintetiche che producono glutammato e glutammina, indispensabili per l'assimilazione dell'ammonio, sono semplici e sono simili in tutte le forme di vita.

Esistono principalmente due vie:

- GDH/GS: in organismi con abbondanti fonti azotate
- GS/GOGAT: nella maggior parte dei batteri del suolo e nelle piante

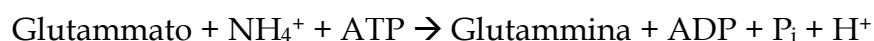
Nel primo caso intervengono gli enzimi glutammato deidrogenasi (GDH) e glutammina sintetasi (GS); nel secondo caso intervengono gli enzimi glutammina sintetasi e glutammato sintasi (o glutammato osso-glutarato ammino-transferasi, GOGAT). La via mediante gli enzimi GDH/GS è energeticamente più efficiente, ma l'enzima GDH (ubiquitariamente presente negli organismi) ha una bassa affinità per l'ammonio ($K_m \approx 1\text{mM}$) quindi risulta una via meno utilizzata perché solo raramente la concentrazione di ione ammonio è così alta da innescare la reazione della GDH, che è la seguente:



Per questi motivi, in genere, la reazione maggiormente utilizzata dai batteri del suolo e dalle piante è la via che prevede la partecipazione degli enzimi GS/GOGAT.

La via della GS/GOGAT prevede due reazioni: nella prima, il Glu (E) e lo ione ammonio reagiscono tra loro per formare la Gln (Q) in una reazione catalizzata dalla GS. Questa reazione avviene in due tappe con un intermedio che è il γ -glutammina-fosfato che rimane legato all'enzima (Fig. 6A).

1^a reazione:



La seconda reazione prevede l'intervento della glutammato sintasi che catalizza l'amminazione riduttiva dell' α -chetoglutarato, un intermedio del ciclo dell'acido citrico, utilizzando la glutammina come donatore di gruppi amminici per rigenerare il glutammato.

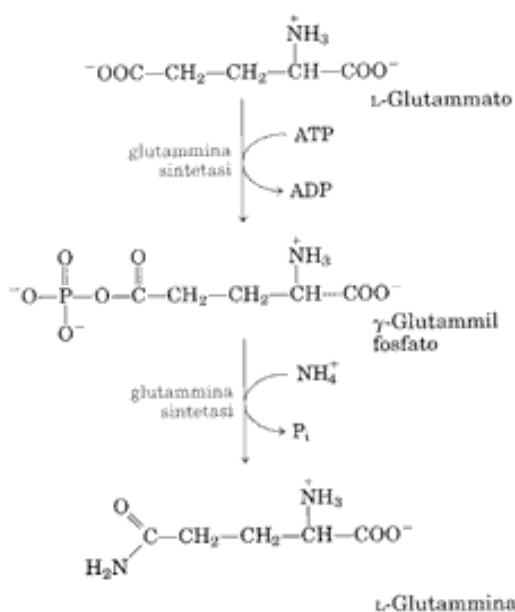
2^a reazione:



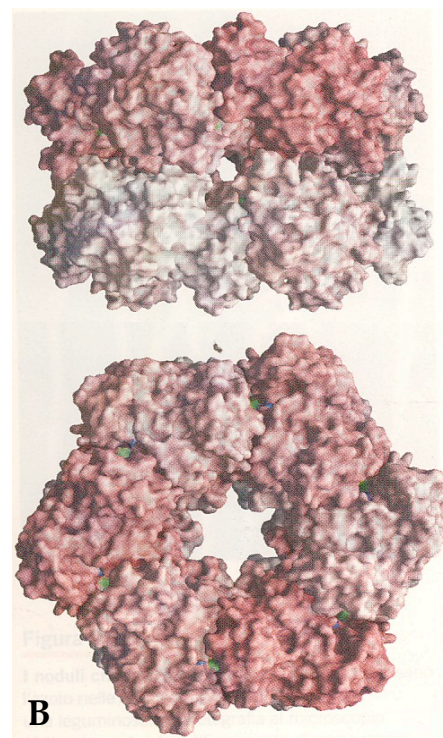
La glutammina sintetasi è presente in tutti gli organismi, a differenza della glutammato sintasi che non è presente negli animali. Oltre ad essere importante per l'assimilazione dell'ammoniaca, questa reazione rappresenta un punto centrale del metabolismo degli amminoacidi nei mammiferi; in effetti è la via principale per rimuovere l'ammoniaca libera, tossica per i tessuti, e per convertirla in un composto non tossico, la glutammina, da trasportare nel sangue.

La glutammina sintetasi è altamente regolata in tutti gli organismi, cosa non sorprendente se si pensa al suo ruolo fondamentale come punto di ingresso dell'azoto ridotto nel metabolismo cellulare. Come vedremo la proteina PII, nei

batteri, ha un ruolo chiave nella regolazione dell'attività di questo importante enzima metabolico.



A



B

Figura 6: (A) Reazione di legame dell'ammoniaca al glutammato con formazione di glutammina ad opera della glutammina sintetasi. La reazione richiede ATP ed avviene in due tappe. Nella prima il glutammato reagisce con l'ATP formando ADP e l'intermedio γ-glutammina fosfato, quest'ultimo reagisce poi con l'ammoniaca, producendo glutammina e fosfato inorganico. La glutammina sintetasi è presente in tutti gli organismi svolgendo sempre un ruolo centrale nel metabolismo. Nei microrganismi questo enzima rappresenta il punto di ingresso dell'azoto fissato nei sistemi biologici. (B) Vista laterale e vista dall'alto della struttura in subunità della glutammina sintetasi, determinata dalla diffrazione dei raggi X. Le 12 subunità sono identiche, sono state colorate diversamente per una migliore identificazione delle posizioni e delle interazioni. In verde sono mostrati i siti attivi. Da Nelson e Cox 2002.

• La regolazione della glutammina sintetasi

La GS è un enzima altamente regolato sia a livello trascrizionale che *post*-trascrizionale [Merrick e Edwards 1995]. La regolazione della glutammina sintetasi è un meccanismo fondamentale per tutti gli organismi viventi. Nei batteri enterici, come *Escherichia coli*, la sua regolazione è molto complessa. L'enzima possiede 12 subunità identiche (Fig. 6B) ed è regolato allostericamente e mediante modificazioni covalenti. Almeno sei prodotti finali del metabolismo della Glutammina (His, Trp, AMP, CTP, carbamoyl-fosfato, glucosamin-6-fosfato), oltre all'Alanina (Ala) e la

Glicina (Gly) (considerati indicatori dello stato generale del metabolismo cellulare degli aminoacidi), sono inibitori allosterici dell'enzima (Fig. 7A). Ogni inibitore promuove solo un'inibizione parziale, mentre l'effetto combinato di inibitori diversi diventa più che additivo: gli otto inibitori insieme bloccano praticamente l'attività enzimatica. Questo meccanismo di controllo consente di aggiustare istante per istante il rifornimento di Glutammina ai processi metabolici dell'organismo.

Sovrapposta all'inibizione allosterica, vi è l'inibizione dovuta all'adenililazione (aggiunta di Adenosina Monofosfato, AMP) della tirosina in posizione 397 (Tyr³⁹⁷), localizzata vicino al sito attivo dell'enzima (Fig. 7B). Questa modificazione covalente determina nell'enzima da un lato un aumento della sensibilità all'inibizione allosterica, e dall'altro una diminuzione dell'attività catalitica dell'enzima in funzione del numero di subunità adenililate. Il meccanismo di questa regolazione è stato svelato da una serie di esperimenti biochimici iniziati alla fine degli anni '60. I primi studi hanno mostrato che due componenti proteiche, PI e PII, erano coinvolte nel processo di adenililazione e deadenililazione della GS di *E. coli* [Shapiro 1969]. È stato determinato successivamente, che la componente PI comprendeva due diverse attività enzimatiche: un'adenililtransferasi ed un'uridililtransferasi. Oggi infatti si sa che l'inserzione e la rimozione del gruppo AMP sulla GS sono catalizzate dall'enzima adenililtransferasi (AT), che fa parte di una cascata enzimatica complessa, che risponde ai livelli di glutammina, α -chetoglutarato, UTP, ATP e P_i.

L'attività dell'AT (codificata dal gene *glnE*) viene modulata dal legame ad una proteina regolatrice, chiamata comunemente PII, la cui attività è a sua volta modulata da una modificazione covalente per uridililazione (aggiunta di Uridina Monofosfato, UMP) di un residuo di Tirosina in posizione 51 (Tyr⁵¹). L'AT associata alla PII uridililata (PII-UMP) stimola la deadenililazione della GS, che si attiva; lo stesso complesso, ma con la PII deuridililata, stimola l'adenililazione della GS, con conseguente riduzione della sua attività enzimatica.

L'uridililazione e la deuridililazione della PII sono catalizzate da un solo enzima, l'uridililtransferasi (UT), codificato dal gene *glnD* e che possiede entrambe le attività catalitiche. L'uridililazione è inibita dal legame della glutammina e del P_i all'UT, ed è stimolata dal legame dell' α -chetoglutarato e dell'ATP a PII (Fig. 7C).

Il risultato a cui perviene questo complesso meccanismo è una diminuzione dell'attività della GS quando i livelli di Glutamina sono elevati (condizioni di elevata concentrazione di azoto) e quindi la proteina PII è deuridilata ed inattiva indirettamente la GS; si avrà invece un aumento dell'attività dell'enzima GS, quando i livelli intracellulari di Glutamina sono bassi (condizioni di carenza d'azoto), ma sono disponibili sia ATP, sia α -chetoglutarato (substrati della reazione sintetica) e la proteina PII-UMP sarà responsabile dell'attivazione della GS tramite l'AT.

Oggi è ampiamente riconosciuto che non esiste probabilmente alcuna nicchia ecologica sulla Terra in cui i batteri non siano riusciti ad evolvere dei meccanismi che consentano loro di sfruttare qualsiasi nutriente disponibile per la loro sopravvivenza e riproduzione, anche in ambienti fortemente sfavorevoli per qualsiasi altro

organismo vivente. A dispetto di questa enorme versatilità metabolica dei batteri, esistono dei meccanismi fondamentali per regolare ed integrare la sintesi e l'attività delle molecole enzimatiche, che restano costanti. Al centro di questo controllo metabolico, risulta di assoluta importanza la necessità di coordinare il catabolismo e l'assimilazione delle risorse carboniose ed azotate, che consentono di massimizzare i tassi di crescita potenziale di un particolare regime nutrizionale. Nelle maggiori famiglie di Eubatteri ed Archeobatteri sembrano esserci davvero rarissimi esempi di meccanismi di questo tipo assolutamente conservati. Le proteine che appartengono alla famiglia PII sono indubbiamente una delle classi di proteine che agiscono come segnali di trasduzione più conservate nel mondo dei batteri [Arcondeguy *et al.* 2001]. Dalla sua iniziale identificazione nel 1969 [Shapiro 1969] fino ad oggi, è stato scoperto che questa famiglia di proteine gioca un importante ruolo nel coordinare il metabolismo dell'azoto in un'ampia varietà di batteri.

Come abbiamo visto nel sottoparagrafo precedente, la proteina PII in *Escherichia coli*, è responsabile della regolazione dell'enzima Glutammina Sintetasi, in quanto il suo stato di uridililazione influenza l'attività dell'AT che è responsabile dello stato di adenililazione, e quindi del funzionamento, della GS. Analisi genetiche sulla regolazione della GS in *Klebsiella aerogenes*, hanno portato luce sui geni coinvolti in questi processi. Le prime mutazioni nel gene *glnB* che codifica per PII, sono state isolate in *K. aerogenes* nel 1973 selezionando mutanti che necessitavano di glutammina per crescere [Prival *et al.* 1973]. Sono stati identificati due classi di mutanti, quelli in cui i livelli di GS erano non rilevabili, considerati come mutanti nel gene *glnA*, ed una seconda classe con un bassissimo livello di GS, considerati come mutanti nel gene *glnB*. In quello studio è stato correttamente postulato che *glnA* era il gene codificante per la GS ed il gene *glnB* codificava per un attivatore richiesto per la sintesi di GS e per la regolazione della sintesi in risposta alla disponibilità di azoto. Il prodotto del gene *glnB* è stato finalmente identificato come PII da Foor e collaboratori nel 1980 che mostrarono che nel mutante originale *glnB* di *K. aerogenes*, la proteina PII era alterata in modo da non poter essere uridililata in condizioni limitanti di azoto e, conseguentemente, non poteva stimolare la deadenililazione della GS da parte dell'AT [Foor *et al.* 1980]. Una seconda classe di mutazioni in *glnB* è derivata dalla perdita di PII; questi mutanti nulli erano ancora capaci di

adenililare/deadenililare la GS, sebbene la velocità di queste reazioni fosse sensibilmente ridotta. Inoltre l'assenza di PII portava anche a più alti livelli di sintesi della GS in presenza di ammonio, indicando un ruolo di PII nella regolazione dell'espressione della GS, oltre che nella sua attività. Il gene *glnB* di *E. coli* è stato per la prima volta sequenziato nel 1987 e la sequenza aminoacidica ottenuta era in perfetto accordo con quanto era stato precedentemente pubblicato. L'isolamento di ulteriori auxotrofi per la glutammina di *E. coli* e di *K. aerogenes* ha portato all'identificazione di due geni: *glnD*, codificante per l'enzima UT e *glnE*, codificante per l'AT, che sono stati sequenziati nel 1993.

Successivi studi genetici effettuati su diversi microrganismi come *E. coli*, *K. aerogenes*, *K. pneumoniae* e *Salmonella enterica*, hanno permesso di identificare un sistema a due componenti per la regolazione dell'azoto (*ntr*), codificato dai geni *ntrBC*, che era responsabile del controllo trascrizionale degli enzimi coinvolti nell'assimilazione e nel catabolismo dell'azoto [Merrick e Edwards 1995]. Il rapporto tra NtrBC e PII è stato spiegato da ulteriori studi genetici effettuati in *E. coli* che hanno portato a proporre che PII modula l'attività della proteina NtrB, un recettore istidina-chinasico che fosforila e defosforila NtrC, un tipico fattore di trascrizione dipendente dal fattore σ^{54} . In particolare, in condizioni di alto azoto, PII deuridililata forma un complesso con NtrB che defosforila, e quindi inattiva, NtrC-P.

L'uridililazione di PII, in condizioni di scarsa disponibilità di azoto, impedisce la formazione del complesso con NtrB, che quindi fosforila NtrC, che attiva la trascrizione di numerosi geni regolati da azoto, tra cui *glnK*, *amtB* e *glnA* (codificante per la GS) [Forchhammer 2004]. La comprensione di questo meccanismo ha reso PII una proteina chiave che funge da sensore e trasduttore dello *status* intracellulare di azoto, modulando l'attività della proteina NtrC (Fig. 8).

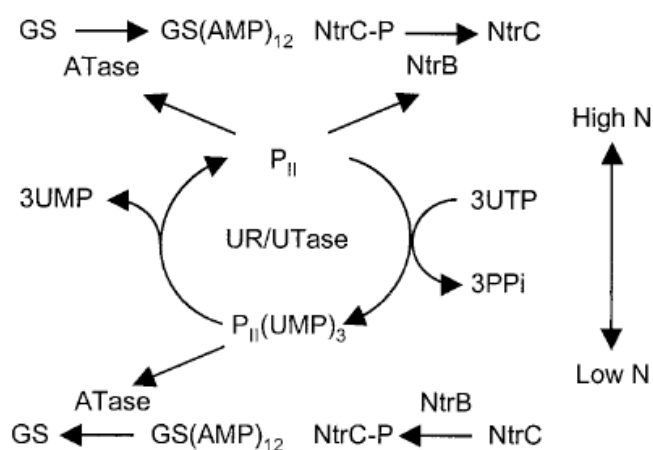


Figura 8: Sistema di regolazione della azoto (*ntr*) dei batteri enterici. Le attività della GS e di NtrC sono regolate in risposta allo *status* intracellulare di azoto. L'UT catalizza l'uridililazione e la deuridililazione di PII. L'AT catalizza l'adenilazione e la deadenilazione di GS. NtrB catalizza la fosforilazione e la defosforilazione del fattore trascrizionale NtrC. Da Arcondeguy *et al.* 2001.

Sebbene dal 1990 i dettagli molecolari del sistema *ntr* enterico fossero chiari, c'erano ancora alcune cose da chiarire. Tra queste sembrava che l'UT avesse un ruolo nella regolazione dell'*ntr* in modo indipendente da PII. Similarmente cellule prive di PII regolavano normalmente l'adenilazione della GS, mentre esperimenti *in vitro* mostravano che la deadenilazione della GS mediante l'AT richiedeva assolutamente la presenza di PII-UMP. Inoltre un doppio mutante *glnB glnD* non deadenilava correttamente la GS in condizioni limitanti di azoto, indicando che l'UT era richiesta anche per l'adenilazione della GS in assenza di PII. Nell'insieme, tutti questi risultati suggerivano l'esistenza di almeno un'altra proteina coinvolta nella regolazione di *ntr* e nell'adenilazione della GS e che fosse anche un substrato dell'UT. Indicazioni del fatto che questo modello fosse incompleto non provenivano solo da studi effettuati su *E. coli*, ma anche da studi sul controllo da azoto dei geni *nif*, responsabili della fissazione dell'azoto in *K. pneumoniae*. La presenza di un secondo gene PII in *E. coli* è stata confermata nel 1995 con l'identificazione dell'omologo di *glnB* definito *glnK*. Ironicamente questo gene era stato sequenziato già nel 1993, ma non era stato annotato dai ricercatori come gene responsabile della regolazione dell'azoto. La proteina GlnK di *E. coli* ha un'identità di sequenza del 67% rispetto a GlnB a livello della sequenza aminoacidica. Inoltre questa proteina è codificata in un operone che contiene un secondo gene a valle, che è il gene *amtB*, codificante per un trasportatore dell'ammonio ad alta affinità. La Tyr⁵¹ è conservata in questa proteina e

infatti, in condizioni limitanti di azoto, è soggetta ad uridililazione su questo residuo in un modo simile a quanto si verifica per GlnB.

Il sequenziamento del genoma di *E. coli* ha confermato la presenza di due geni PII-like in questo batterio, situazione ritrovata anche in molti altri batteri; alcuni microrganismi hanno anche un numero maggiore di geni di questa famiglia proteica. Come abbiamo detto nel primo paragrafo, i geni codificanti per proteine PII sono ubiquitari nei procarioti, essendo stati ritrovati in numerosissimi microrganismi, tra cui Proteobatteri, Actinobatteri, Cianobatteri ed Archeobatteri. Tuttavia esiste un significativo numero di microrganismi che non possiedono alcuna proteina PII-like. Tra questi possiamo annoverare *Helicobacter pylori*, molti batteri dei generi *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Rickettsia* e *Pyrococcus*. La maggior parte di questi microrganismi sono patogeni, i cui genomi sono sottoposti solo ad una leggera pressione evolutiva per competere per specifiche nicchie all'interno dei rispettivi ospiti. Spesso essi sono dipendenti dai loro ospiti per quanto riguarda l'approvvigionamento dei composti azotati e probabilmente non si ritrovano di fronte a cambiamenti ambientali tali da richiedere un monitoraggio ed un controllo costante del loro *status* intracellulare dell'azoto.

L'iniziale caratterizzazione della proteina PII di *E. coli* mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) e successive centrifugazioni indicavano che questa proteina formasse un tetramero [Adler *et al.* 1975]. In realtà, successivi studi di cristallografia a raggi X hanno mostrato che si tratta di un omo-trimero. La massa molecolare di un monomero di PII è stata analizzata mediante spettrometria di massa MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) e corrisponde a 12,435 Da, che è in accordo con quella predetta basandosi sulla sequenza del DNA di 12,427 Da [Vasudevan *et al.* 1994]. Ogni monomero della proteina GlnB di *E. coli* contiene due α -eliche e sei foglietti- β organizzati in modo che le due α -eliche e quattro dei foglietti- β formino un doppio motivo $\beta\alpha\beta$ connesso da un largo *loop* che si estende dalla Gly-37 alla Phe-55. All'apice di questo *loop*, definito proprio per questa ragione T-loop è posizionato il sito di uridililazione, Tyr⁵¹. Un *loop* più piccolo, il B-loop, si estende dalla Gln-82 all'Asp-88 e separa la seconda α -elica dal quarto foglietto- β . Infine un terzo *loop*, il C loop, si trova all'estremità C-terminale della proteina e contiene gli ultimi

due foglietti- β . Legami a ponte idrogeno inoltre, stabilizzano la struttura terziaria della proteina: tra la Gly-27 e la Val-64, tra Glu-106 ed Arg-101 e tra Thr-104 e Gly-105. L'omo-trimero è organizzato nello spazio in modo che i quattro foglietti- β principali di ogni monomero sono fiancheggiati da una parte dal T-loop del secondo monomero e dall'altra dal C-loop del terzo monomero (Fig. 9A). Questa disposizione dei monomeri porta alla formazione di tre fessure tra T-loop e B-loop di un monomero ed il C-loop del monomero successivo; queste fessure corrispondono ai tre siti di legame per l'ATP [Forchhammer 2004]. In presenza di ATP, possono legarsi al trimero di PII fino a tre molecole di 2-ossoglutarato; inoltre i tre siti di legame per l'ATP possono essere occupati in maniera competitiva da molecole di ADP [Forchhammer 2008]. I tre gruppi di foglietti- β sono organizzati in modo da formare una struttura cilindrica "a barile" con al centro una cavità. La struttura della proteina omo-trimerica GlnK di *E. coli* è molto simile a quella di GlnB (Fig. 9B).

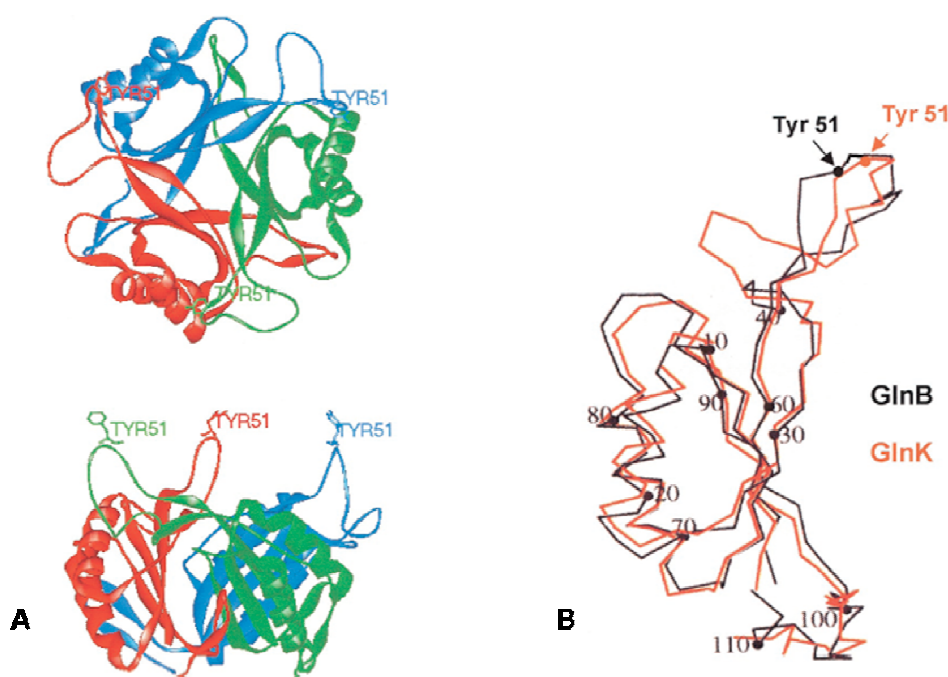


Figura 9: (A) Struttura della proteina omo-trimerica GlnB di *E. coli* vista da sopra (in alto) e lateralmente (in basso). I tre diversi monomeri sono colorati in rosso, verde e blu. Il residuo di Tirocina in posizione 51 che è soggetta ad uridililazione è indicato per ciascun monomero. (B) Comparazione delle strutture delle proteine GlnB (in nero) e GlnK (in rosso) di *E. coli*. La posizione della Tyr-51 è indicata per ciascun monomero. Da Arcondeguy *et al.* 2001.

Le differenze sono soprattutto a livello del T-loop e degli altri due *loop*. Inoltre sembra che, in entrambe le proteine, i *loop* possano essere presenti in diverse conformazioni indicando che siano flessibili piuttosto che rigidi. Il T-loop della proteina GlnB di *E. coli* è essenziale per l'interazione con diversi *target* come l'AT, l'UT e NtrB. Questi differenti *target* potrebbero richiedere differenti conformazioni del T-loop per facilitare interazioni specifiche ad alta affinità.

I monomeri delle proteine GlnB e GlnK di *E. coli* possono formare degli etero-trimeri *in vivo* quando i due geni codificanti sono espressi in un plasmide o quando il ceppo *wild type* (*wt*) viene cresciuto in condizioni limitanti di azoto [van Heeswijk *et al.* 2000]. Esperimenti di adenililazione della GS *in vitro* hanno dimostrato che l'etero-trimero pienamente uridililato è ancora capace di stimolare l'attività di deadenililazione ad opera dell'AT, anche se in misura minore rispetto all'omotrimerico PII-UMP. È stato osservato inoltre che la formazione dell'etero-trimero è possibile anche tra monomeri di GlnB di *Synechococcus* e monomeri di GlnB o GlnK di *E. coli* quando la proteina cianobatterica è espressa in *E. coli*. Sebbene le conseguenze fisiologiche della formazione dell'etero-trimero non siano ancora chiare, ci si potrebbe aspettare che questo avvenga anche in altri organismi che esprimono contemporaneamente più di una forma di PII [Arcondeguy *et al.* 2001].

È stato proposto recentemente che le proteine PII agiscano come un CPU (*central processor unit*) della cellula che risponde essenzialmente a tre diversi segnali metabolici: un segnale energetico mediante l'interazione diretta con molecole di ATP, un segnale "carbonio" mediante il legame con 2-ossoglutarato e un segnale "azoto" che è la glutammina, attraverso l'uridililazione/deuridililazione glutammina dipendente [Forchhammer 2004]. Sebbene questo tipo di modificazione covalente sia ampiamente diffusa tra i procarioti, essa non è universale; negli Actinomiceti Gram+ la modificazione dell'omologo GlnK avviene attraverso adenililazione della Tyr-51, mentre nei batteri del *phylum* dei *Firmicutes*, come *Bacillus subtilis*, sembra non esserci alcuna modificazione. Nei Cianobatteri è stata dimostrata invece una fosforilazione dell'omologo GlnB sul residuo di Serina in posizione 49. Nonostante le modificazioni sembrino quindi differire notevolmente tra le varie linee filogenetiche, la funzione delle proteine PII nei procarioti sembra essere sempre collegata alla regolazione dell'azoto, anche se queste proteine mostrano una notevole variabilità funzionale se

consideriamo la loro capacità di interagire con numerosi *target*. La molteplicità dei possibili ruoli delle proteine PII è rappresentata schematicamente nella figura 10 (Fig. 10).

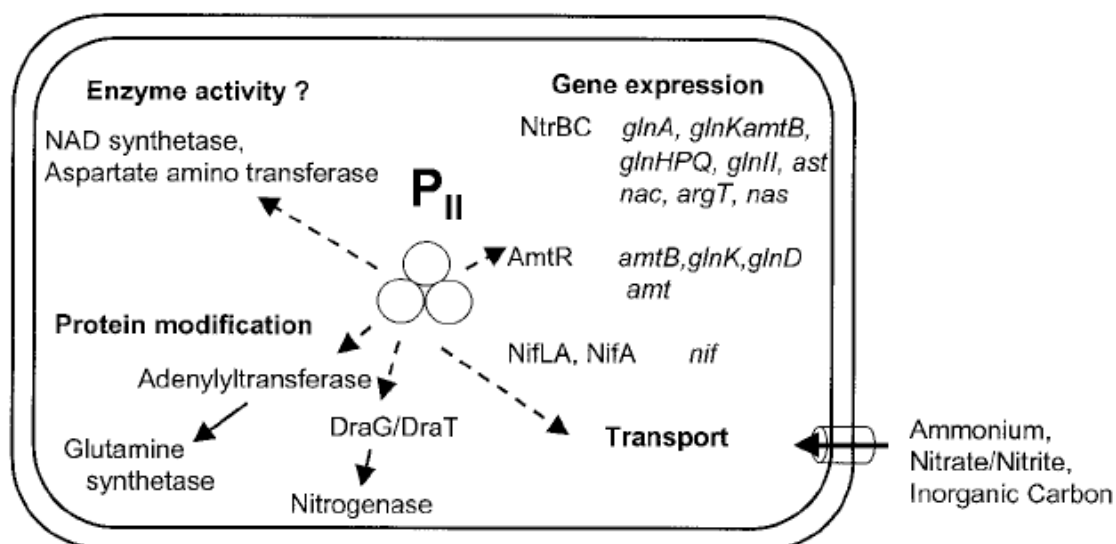


Figura 10: Rappresentazione schematica della potenziale molteplicità di ruoli delle proteine PII. Questo schema riassume numerose informazioni, definitive o parziali, ottenute dallo studio di numerosi organismi. Da Arcondeguy *et al.* 2001.

Il fatto che in molti organismi sono stati ritrovati più geni codificanti per proteine PII ha aggiunto un ulteriore strato di complessità ed è estremamente probabile che ci siano ancora numerosi altri ruoli delle proteine PII ancora da scoprire.

Oltre al già citato coinvolgimento nella regolazione della GS e del sistema *ntr*, è stata dimostrata l'interazione delle proteine PII con il trasportatore dell'ammonio omotrimerico AmtB. Il legame della proteina GlnK di *E. coli* al canale transmembrana per l'ammonio AmtB controlla l'influsso di ammonio nella cellula in risposta a variazioni dello *status* intracellulare di azoto [Conroy *et al.* 2007]. Studi recenti di cristallografia a raggi X hanno chiarito la struttura del complesso che si forma tra GlnK e AmtB nel batterio enterico *E. coli*: l'interazione avviene quasi esclusivamente attraverso la lunga superficie dei tre T-loop, i cui apici si inseriscono perpendicolarmente e profondamente nel lato citoplasmatico delle tre subunità del canale AmtB, impedendo la conduzione dell'ammonio (Fig. 11). In particolare, il residuo R47 blocca questo canale. L'uridililazione del residuo Tyr⁵¹ impedisce la formazione del

complesso tra GlnK e AmtB. Sembra che l'ADP stabilizzi il complesso GlnK-AmtB, al contrario l'ATP ed il 2-ossoglutarato ostacolano fortemente la formazione del complesso, in quanto il legame di questi due effettori non fa assumere al T-loop la conformazione estesa necessaria per entrare nel canale AmtB ed il 2-ossoglutarato impedisce fisicamente il contatto tra GlnK e AmtB [Forchhammer 2008]. Anche negli Actinobatteri la proteina GlnK non modificata lega AmtB, mentre quella modificata, in questo caso per adenililazione, interagisce con il repressore trascrizionale AmtR, portando alla repressione del gene.

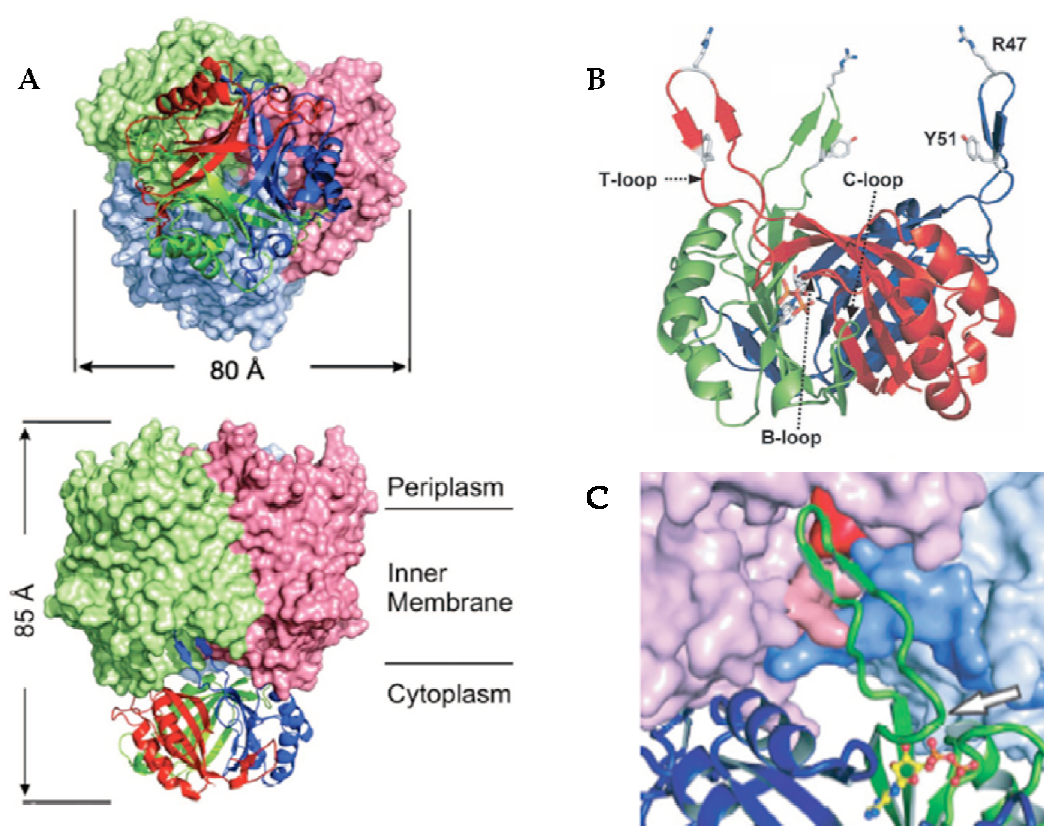


Figura 11: Panoramica del complesso AmtB-GlnK. (A) Ogni subunità AmtB e GlnK è mostrata con una colorazione indipendente. Vista del complesso dal lato citoplasmatico (in alto); vista del complesso in maniera laterale sullo stesso piano della membrana citoplasmatica (in basso). (B) Particolare sulla conformazione della proteina GlnK nel complesso. I tre monomeri della proteina sono colorati in modo indipendente (rosso, blu e verde); la struttura del trimero mostra che i T-loop di tutti e tre i monomeri si estendono dal corpo principale della proteina. (C) Ingrandimento dell'interazione del T-loop della proteina GlnK ed il lato citoplasmatico del poro AmtB con conseguente blocco del trasporto di ammonio. Sono mostrate due subunità della proteina AmtB (in rosa e azzurro) e due monomeri di GlnK (blu e verde). Il T-loop di uno dei due monomeri rappresentati della proteina GlnK (in verde) si inserisce nella cavità del lato citoplasmatico della subunità rosa del poro AmtB. La superficie del lato citoplasmatico della proteina AmtB con il T-loop della proteina GlnK è enfatizzata dal colore rosso e salmone, mentre il residuo C-terminale della subunità vicina è enfatizzato con il colore blu. Da Conroy *et al.* 2007.

Inoltre è stato visto che le proteine PII hanno un ruolo chiave nella fissazione dell'azoto, interagendo con proteine come NifA o NifL e con l'enzima nitrogenasi [Little *et al.* 2002; Dodsworth e Leigh 2007].

La proteina NifA è un attivatore trascrizionale dei geni responsabili della fissazione dell'azoto (geni *nif*); NifL è una proteina richiesta per regolare l'attività di NifA in risposta all'ossigeno ed all'azoto fissato. Sembra che le proteine PII abbiano, in alcuni organismi, un ruolo sia nella regolazione dell'espressione dei due geni codificanti per queste proteine, sia nella regolazione della loro attività a livello *post*-traduzionale. Inoltre è stato dimostrato in alcuni batteri, che PII regola anche l'attività della nitrogenasi giocando un ruolo chiave nella regolazione del sistema DraG-DraT. La nitrogenasi infatti, viene regolata mediante un meccanismo di ADP-ribosilazione in risposta ad ammonio, variazioni dello stato energetico e spostamento in condizioni di anaerobiosi. Questa reazione è reversibile e catalizzata dagli enzimi DraT (*dinitrogenase reductase ADP-ribosyl transferase*), che ribosila uno specifico residuo di arginina, l'Arg¹⁰¹, di una subunità dell'omo-dimero della dinitrogenasi reductasi, inattivando l'enzima e DraG (*dinitrogenase reductase activating glucosylhydrolase*), che rimuove il gruppo ribosile, riattivando l'enzima. DraG sembra interagire con GlnK, in una maniera molto diversa dall'interazione GlnK-AmtB [Forchhammer 2008]. Il legame non è influenzato da modifiche della proteina GlnK e non è competitivo rispetto al legame GlnK-AmtB. Infatti, quando GlnK lega AmtB, sequestra DraG dal citoplasma e la mantiene vicino alla membrana citoplasmatica, presumibilmente attraverso la formazione di un complesso ternario DraG-GlnK-AmtB. In questo stato DraG non è più in grado di rimuovere il gruppo ribosile dalla dinitrogenasi reductasi, che rimane inattiva fino a quando il complesso non si dissocia nuovamente (Fig. 12A). Un meccanismo simile si verifica tra il complesso AmtB-GlnK di *Bacillus subtilis* ed il fattore di trascrizione dei geni legati allo stress da azoto, TnrA. L'omologo GlnK di questo batterio non è modificato covalentemente e l'operone *amtB-glnK* è espresso solo in condizioni limitanti di azoto. TnrA lega il complesso di membrana AmtB-GlnK, mentre non lega GlnK libero; in questo modo il fattore di trascrizione viene sequestrato da questo complesso in determinate condizioni fisiologiche, come condizioni energetiche limitanti. Elevate concentrazioni di ATP infatti determinano la dissociazione del complesso e la liberazione di TnrA (Fig. 12B).

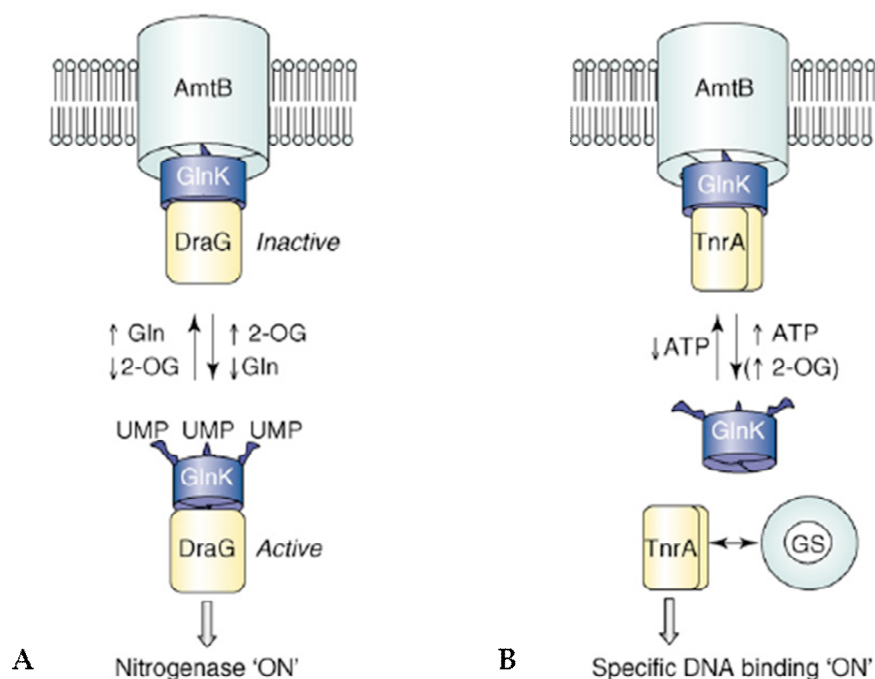


Figura 12: Nuovi meccanismi di regolazione mediati da PII. PII controlla la disponibilità di fattori di regolazione attraverso la formazione di un complesso proteico e l'immobilizzazione nei pressi della membrana citoplasmatica. (A) Modello della regolazione di DraG dipendente da PII. GlnK lega DraG a prescindere dal suo stato di uridililazione. In eccesso di azoto GlnK diviene deuridililato a causa dell'incremento dei livelli di glutammina intracellulari e si lega alla proteina di membrana AmtB. Di conseguenza DraG è sequestrato a livello della membrana e non può promuovere la rimozione del gruppo ribosile dalla dinitrogenasi riduttasi, lasciandola nella forma inattiva. In carenza di azoto, la dissociazione del complesso GlnK-AmtB è promossa dall'incremento dei livelli di 2-ossoglutarato. (B) Modello che spiega la localizzazione di TnrA mediata dalla proteina PII. La proteina GlnK di *B. subtilis* forma un complesso di membrana con la proteina AmtB in condizioni di bassi livelli di ATP, con conseguente legame del fattore di trascrizione TnrA. Un aumento nei livelli di ATP porta alla dissociazione del complesso legato alla membrana, rilasciando TnrA nel citosol, andando ad interagire con la GS e con i siti di legame specifici al DNA per regolare la trascrizione di alcuni geni. Da Forchhammer 2008.

La struttura del complesso GlnK-AmtB di *E. coli* è probabilmente rappresentativa rispetto a quella di molti altri complessi GlnK-AmtB, mentre le molecole a valle che interagiscono con questo complesso potrebbero variare notevolmente generando meccanismi di risposta molto diversi nei diversi organismi [Forchhammer 2008].

Le proteine appartenenti alla superfamiglia delle proteine PII potrebbero inoltre avere, in alcuni organismi, un ruolo nel trasporto di nitrato, ammonio, metilammonio e carbonio inorganico ed un ruolo nello sviluppo del nodulo [Arcondeguy *et al.* 2001].

Infine, un recente saggio di *yeast-two hybrid* delle proteine PII in *Rhodobacter capsulatus* ha rivelato una nuova ed inaspettata interazione della proteina PII con PcrA, una

putativa DNA elicasi e con Era, una GTPasi coinvolta nell'assemblaggio dei ribosomi [Pawlowski *et al.* 2003; Forchhammer 2004]. Sebbene il significato funzionale di queste interazioni rimane da chiarire, potrebbe essere un'indicazione che le proteine PII siano coinvolte anche nella regolazione della replicazione, della trascrizione e della traduzione in organismi sottoposti a determinate condizioni nutrizionali.

1.2.3 Le proteine PII nei cianobatteri

I cianobatteri chiamati anche impropriamente alghe azzurre o *Cianoficee*, sono un *phylum* di batteri fotosintetici, in grado di sopravvivere in condizioni ambientali estreme. Sono organismi unicellulari procarioti, fotoautotrofi e costituiscono uno dei 23 *phyla* del regno delle *Monere* o *Bacteria*. La fotosintesi nei cianobatteri ha luogo nella loro membrana tilacoidea, in un modo analogo a quanto avviene nei cloroplasti delle alghe, dei muschi, delle felci e delle piante superiori. Infatti, come già accennato, secondo la teoria degli Endosimbionti, furono antenati degli odierni cianobatteri i precursori dei cloroplasti delle piante verdi. Per la fotosintesi i cianobatteri non utilizzano solo quella parte dello spettro visibile che utilizzano anche le piante verdi: oltre alla clorofilla a, possiedono altri pigmenti fotosintetici, le ficobiline, tra cui la ficocianina (azzurro) e la ficoeritrina (rosso). La ficocianina dona a molti cianobatteri la caratteristica colorazione blu, anche se il rapporto delle concentrazioni dei singoli pigmenti può variare di molto, conferendo ai batteri diversi tipi di colorazioni. I pigmenti presenti permettono lo sfruttamento di una vasta porzione dello spettro visibile ed hanno un'efficienza del processo di raccoglimento della luce anche più elevata della clorofilla. In questo modo, i cianobatteri possono sopravvivere con successo anche in condizione di scarsa luminosità, come ad esempio nelle profondità marine o in ecosistemi acquatici caratterizzati da forte corrente. Alla fine degli anni '80 Sanders e collaboratori effettuarono una serie di esperimenti con ^{32}P nel cianobatterio unicellulare attualmente definito *Synechococcus elongatus* ceppo PCC 6301 per studiare l'effetto di diverse qualità di luce sulla fosforilazione delle proteine [Sanders *et al.* 1989]. Una delle proteine maggiormente marcate compariva quando i batteri erano sottoposti a

luce arancione ed era caratterizzata da un peso molecolare di 12,5 kDa. Il sequenziamento N-terminale della proteina marcata purificata ha rivelato l'omologia con l'N-terminale della proteina GlnB di *E. coli*. Successivamente, omologhi di *glnB* sono stati ritrovati anche in altri ceppi. La sequenza aminoacidica della proteina ha rivelato un'elevata similarità di sequenza, pari al 62-66%, con la proteina GlnB di *E. coli* e altri proteobatteri ed è stata considerata appartenente alla superfamiglia di segnali di trasduzione PII. Come precedentemente osservato, nonostante sia presente la Tyr⁵¹, questa non viene modificata per uridililazione, come avviene nei batteri enterici, ma la modifica covalente, questa volta per fosforilazione, avviene su un altro residuo aminoacidico: la Ser⁴⁹. In seguito alla scoperta del gene *glnB* in *S. elongatus*, è stata effettuata un'analisi mediante *Southern Blot* per cercare la presenza di omologhi di *glnB* in altri cianobatteri. Questo studio, insieme al sequenziamento del genoma di numerosi organismi appartenenti a questo *phylum* batterico, ha portato ad affermare che esiste nel genoma dei cianobatteri in tutti i casi analizzati, un solo gene omologo a *glnB* e nessun gene omologo a *glnK* di *E. coli*. L'unica eccezione trovata fino ad oggi è rappresentata dall'organismo *Gloeobacter violaceus*, un cianobatterio che ha perso la membrana tilacoidale e che possiede due geni *glnB-like* [Nakamura *et al.* 2003].

La proteina PII dei cianobatteri è regolata anche a livello trascrizionale. È stato osservato lo stesso livello di espressione genica in cellule di *Synechococcus* cresciute in presenza di nitrato o ammonio, ma si incrementava di circa 10 volte dopo 7 ore di privazione di azoto. Inoltre quando le cellule venivano trasferite al buio, dopo 5 ore, il trascritto di PII arrivava a livelli talmente bassi da essere appena rilevabile e questo effetto poteva essere bloccato dall'aggiunta di glucosio nel mezzo di crescita [Moorhead e Smith 2003].

L'allineamento di sequenza di diverse proteine GlnB cianobatteriche e la comparazione con quelle degli altri batteri ha portato all'identificazione di una sequenza, di 14 aminoacidi, caratteristica delle proteine PII dei cianobatteri. Molti di questi aminoacidi sono localizzati all'interno o nelle vicinanze della regione del T-loop, compresa la Ser⁴⁹ [Forchhammer 2004]. La proteina trimerica GlnB nei cianobatteri esiste in quattro differenti forme: una forma non modificata e tre forme modificate con uno, due o tre subunità fosforilate. Queste proteine, come le altre proteine PII batteriche, rispondono allo *status* intracellulare dell'azoto. Nelle cellule

che crescono in presenza di ammonio, la proteina PII è quasi totalmente presente nella forma defosforilata; in presenza di nitrato come unica fonte azotata lo stato di fosforilazione della proteina PII è ad un livello intermedio; infine nelle cellule che crescono in assenza di azoto, PII è completamente fosforilata. In realtà non sono le risorse azotate di per sé che regolano lo stato di fosforilazione delle proteine PII, ma la loro assimilazione attraverso la via della GS/GOGAT; infatti l'inibizione di uno degli enzimi di questa via porta ad un forte incremento della fosforilazione di PII, anche in presenza di ammonio. Un simile effetto a quello dell'aggiunta di ammonio sulla defosforilazione di PII, può essere ottenuto inibendo la fissazione di CO₂ o limitando l'apporto di CO₂ alla cellula. Anche differenti condizioni di illuminazione e transizioni buio-luce influenzano lo stato di fosforilazione di PII. La fosforilazione di PII in *S. elongatus*, può essere ottenuta solo in presenza di 2-ossoglutarato ed ATP, che sono dei ligandi delle proteine PII non solo batteriche ma anche cianobatteriche. Nei cianobatteri PII agisce come sensore del livello intracellulare di 2-ossoglutarato, che è il metabolita centrale che segnala il bilancio tra C/N cellulare. Il 2-ossoglutarato infatti è il primo scheletro di carbonio utilizzato per l'incorporazione dell'ammonio e rappresenta il punto di intersezione delle vie metaboliche di carbonio ed azoto. Il gene *pphA*, codifica per la fosfatasi che rimuove il gruppo fosfato dalla proteina PII nei cianobatteri in presenza degli ioni Mg²⁺ e Mn²⁺; questa proteina di 254 aminoacidi esibisce le tipiche caratteristiche biochimiche delle proteine fosfatasi della famiglia PPM (*Mn²⁺/Mg²⁺-dependent protein phosphatase*). Il legame di alcune molecole effettrici a PII-P influenza il riconoscimento molecolare tra PphA e PII-P. In particolare l'ATP, l'ADP e il GTP riducono il tasso di defosforilazione di PII in maniera dipendente dalla concentrazione. In assenza di queste molecole, il 2-ossoglutarato non influenza la defosforilazione, mentre in presenza di ATP aumenta fortemente l'inibizione della defosforilazione di PII. Studi successivi hanno dimostrato che la quantità di proteina PphA è incrementata dal nitrito come metabolita segnale. I livelli di trascritto però erano costitutivi a prescindere dalle risorse azotate, indicando che questa fosfatasi è regolata a livello *post*-trascrizionale [Kloft *et al.* 2005]. La proteina chinasi o le proteine chinasi coinvolte nella fosforilazione delle proteine PII nei cianobatteri devono ancora essere trovate. È stato solo visto che l'attività chinastica è dipendente da ATP ed è stimolata da 2-ossoglutarato.

Recentemente è stata determinata mediante cristallografia a raggi X, la struttura della proteina PII di diversi cianobatteri; mentre il *core* della proteina è simile a quello di GlnB e GlnK di *E. coli*, le strutture del T-loop e del C-loop differiscono fortemente. Entrambi questi *loop* sono flessibili e capaci di modificarsi strutturalmente per assumere diverse conformazioni. Il T-loop delle proteine cianobatteriche è più allungato rispetto al T-loop di PII di *E. coli*, a causa della maggiore estensione dei foglietti- β 2 e 3 (Fig. 13).

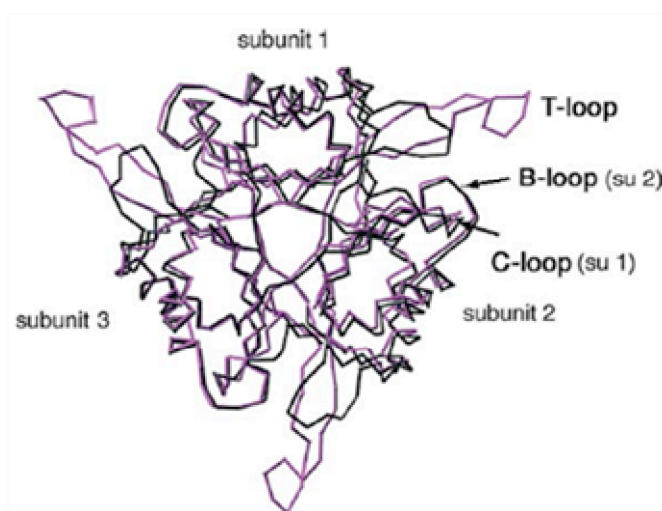


Figura 13: Sovrapposizione delle proteine GlnB di *E. coli* (in nero) e PII di *S. elongatus* (in viola). Sono indicate nella figura le tre subunità del trimero e i T-loop, C-loop e B-loop. Da Forchhammer 2004.

I mutanti deficienti nella proteina PII di *S. elongatus* sono incapaci di acclimatarsi rapidamente ai cambiamenti delle condizioni ambientali, in particolare a spostamenti da mezzi che contengono nitrato a mezzi che contengono ammonio, ad aumenti della concentrazione di CO₂, o improvvisi decrementi dell'intensità luminosa. I mutanti accumulano inoltre più glicogeno rispetto al *wild type*, mentre il contenuto delle proteine totali è minore, indicando un aumento del rapporto C/N cellulare. Diversi studi recenti mostrano che nei cianobatteri, il trasporto del nitrato e del nitrito è regolato in modo dipendente da PII. Il trasporto del nitrato in *S. elongatus* avviene attraverso un trasportatore ABC (*ATP binding cassette*), una permeasi nitrato/nitrito specifica, codificata dai geni *nrtA*, *nrtB*, *nrtC* e *nrtD*. La subunità NrtC che lega l'ATP ha un dominio C-terminale caratteristico, che non è conservato negli altri trasportatori ABC. Questo sito potrebbe essere coinvolto nel controllo mediato dalla

proteina PII. La forma non fosforilata di PII inibisce la nitrato/nitrito permeasi (NRT), mentre in assenza di questa proteina non fosforilata la permeasi è attiva. Ciononostante il solo evento di fosforilazione della PII non basta ad eliminare l'effetto inibitorio sulla nitrato/nitrito permeasi, ma è richiesto il legame di alcune molecole effettrici. Solo quando PII è fosforilata e legata da 2-ossoglutarato ed ATP non inibisce la permeasi; al contrario, la PII defosforilata inibisce la permeasi a prescindere dal legame degli effettori (Fig. 14).

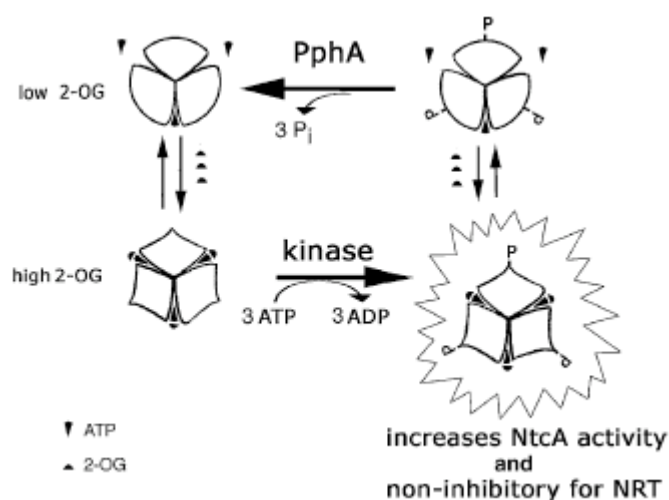


Figura 14: Rappresentazione schematica del modello proposto per il ciclo di fosforilazione di PII in risposta ai livelli di 2-ossoglutarato. In accordo con questo modello, alte concentrazioni di 2-ossoglutarato dovrebbero promuovere la completa occupazione dei siti di legame dei ligandi di PII, portando ad un cambio conformazionale che scatena la fosforilazione di PII. Questa forma di PII totalmente fosforilata e che interagisce con i ligandi, non inibisce più la nitrato/nitrito permeasi (NRT) ed incrementa l'attività del fattore di trascrizione NtcA. La dissociazione del 2-ossoglutarato dalla forma fosforilata avviene quando il livello intracellulare del metabolita si abbassa. Come conseguenza, due molecole di ATP si dissociano dalla PII-P, che viene quindi defosforilata dalla PphA. Da Forchhammer 2004.

Studi fisiologici indicano che PII nei cianobatteri è anche coinvolta nella regolazione dell'utilizzo del nitrato operando in diversi *pathway* indipendenti: quello dell'assorbimento del nitrato controllato dall'ammonio, quello controllato da luce o potenziale redox e probabilmente modulando l'attività della nitrato reduttasi [Forchhammer 2008].

È stato inoltre dimostrato che le proteine PII nei cianobatteri sono coinvolte nell'assorbimento di bicarbonato e CO₂ e nel trasporto dell'ammonio ad opera della permeasi AMT-like codificata dal gene *amt1*, la cui espressione dipende dal fattore di

trascrizione NtcA [Forchhammer 2004]. In tutti i cianobatteri analizzati infatti, il controllo dell'azoto è esercitato a livello trascrizionale dal fattore di trascrizione NtcA, che appartiene alla famiglia di fattori di trascrizione batterica CRP/FNR, mentre il sistema a due componenti NtrB/NtrC, noto per i proteobatteri, non è presente. NtcA è responsabile dell'induzione dell'espressione dei geni regolati da azoto in assenza di ammonio. Inoltre nei cianobatteri dell'ordine *Nostocales*, NtcA è un fattore di controllo chiave per il differenziamento dell'eterocisti, una cellula specializzata per la fissazione dell'azoto [Muro-Pastor *et al.* 2002]. I geni *glnB* di *S. elongatus* e *Synechocystis* sp. hanno due siti di inizio della trascrizione. Un promotore costitutivo debole guida la trascrizione in presenza di ammonio, mentre in assenza di azoto, la maggior parte dei trascritti si originano a partire da un promotore dipendente da NtcA, caratterizzato da un motivo di legame a questo fattore di trascrizione. Diversi studi lasciano intendere che la proteina PII fosforilata nei cianobatteri segnala la mancanza di azoto al fattore di trascrizione NtcA in condizioni di carenza di questo elemento fondamentale. Non è ancora chiaro se PII interagisce con NtcA in modo diretto oppure se l'effetto di PII su NtcA viene trasmesso da un fattore ancora non identificato che agisce su NtcA [Forchhammer 2004]. Recenti studi biochimici hanno rivelato che il 2-ossoglutarato non solo agisce su PII, ma regola anche l'attività di NtcA in modo diretto. Questo metabolita incrementa sia l'affinità di legame al DNA di NtcA, sia l'inizio della trascrizione dei promotori dipendenti da NtcA [Vazquez-Bermudez *et al.* 2002]. Quando i livelli di 2-ossoglutarato sono bassi (in cellule cresciute in presenza di ammonio), NtcA è inattivo, a prescindere dalla regolazione di PII. Quando i livelli di 2-ossoglutarato aumentano, NtcA è attivato direttamente dal 2-ossoglutarato in maniera indipendente da PII. Solo in presenza di PII si avrà però un'ulteriore stimolazione dell'attività di NtcA, ottenuta in cellule cresciute in condizioni di carenza di azoto.

Recentemente nei cianobatteri dei generi *Synechococcus* e *Synechocystis* sono state identificate diverse proteine che interagiscono specificamente con PII. Tra queste, oltre alla già discussa fosfatasi di PII (PphA), ci sono un enzima per la biosintesi degli aminoacidi (NAGK), un probabile canale di membrana (PamA) ed una piccola proteina che interagisce anche con il fattore di trascrizione NtcA (PipX) [Osanai e Tanaka 2007]. La proteina NAGK (*N-acetyl-L-glutamate kinase*), codificata dal gene

argB, è il secondo enzima del *pathway* biosintetico che, nei procarioti, porta alla formazione dell'arginina a partire dal glutammato (Fig. 15A). Analisi biochimiche usando PII e NAGK purificate hanno dimostrato che PII incrementa l'attività di NAGK *in vitro* di circa 40 volte, questo avviene anche perché PII attenua l'inibizione da *feedback* promossa dall'arginina. È stato inoltre dimostrato che un trimero di PII interagisce con un esamero di NAGK e l'interazione è inibita dal 2-ossoglutarato in presenza di ATP o MgCl₂, come da una mutazione nella Ser⁴⁹ di PII. La forma di PII non fosforilata e non legata a 2-ossoglutarato forma un complesso con NAGK con conseguente attivazione della biosintesi dell'arginina, in presenza di fonti azotate (Fig. 15B-C). Questo porta alla sintesi del polimero di riserva di azoto cianoficina (polimero degli aminoacidi arginina ed asparagina) che i cianobatteri sintetizzano durante condizioni di eccesso di questo elemento [Forchhammer 2008]. Recenti studi di cristallografia hanno permesso di ottenere le strutture del complesso PII-NAGK in *S. elongatus*, in modo da comprendere meglio come PII influenzi positivamente l'attività di questo enzima. L'esamero NAGK è costituito da tre omo-dimeri che formano un toroide (una struttura a forma di ciambella con un buco centrale) con due facce identiche [Llacer *et al.* 2007]. L'NAGK è stretta in mezzo a due trimeri di PII, con ogni monomero di PII in contatto con l'adiacente monomero di NAGK (Fig. 15C-D). Una delle due superfici del complesso PII-NAGK è fornita dal corpo centrale della proteina PII che interagisce con il dominio C-terminale di NAGK; l'altra superficie è costituita dal T-loop che adotta una conformazione assomigliante ad un dito ricurvo che è uncinato all'interno del monomero opposto di NAGK. Legami a ponte idrogeno stabilizzano il complesso. Un ruolo importante è ricoperto dal residuo E85 del B-loop: quando il complesso è formato, questo residuo forma un ponte salino con NAGK, mentre nella proteina PII libera forma un ponte salino con il residuo del T-loop R47, stabilizzando la conformazione estesa del T-loop caratteristica della forma libera della proteina PII in *S. elongatus*. Complessivamente si può affermare che il legame di PII provoca un cambio conformazionale tale da modificare il sito di legame allosterico di inibizione dell'arginina ed il centro catalitico di NAGK, che comporta una ridotta affinità nei confronti dell'arginina ed un'elevata affinità per il substrato N-acetylglutammato.

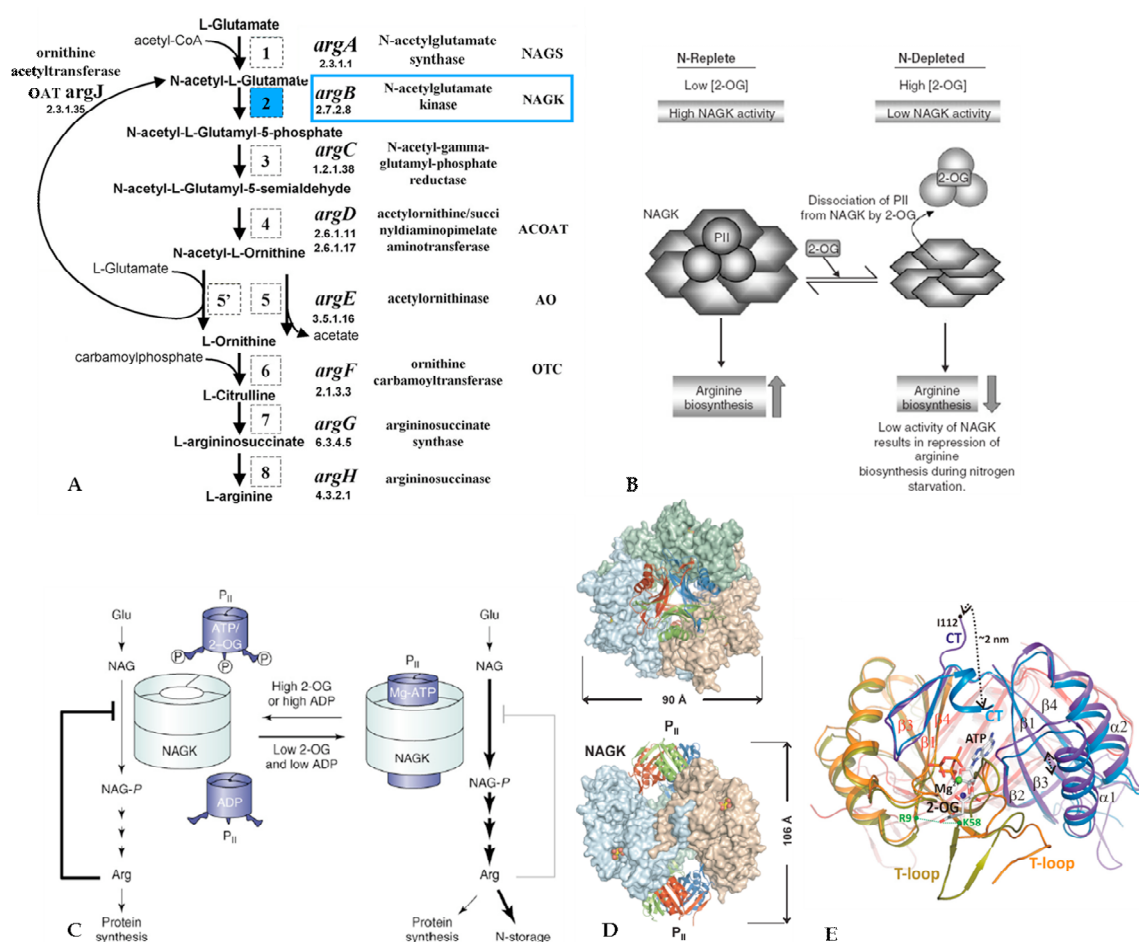


Figura 15: (A) *Pathway* della biosintesi dell'arginina (Arg) a partire dal glutammato. Per ogni *step* (segnato da un numero nei quadratini tratteggiati) sono indicati il nome del gene dell'enzima, il numero EC (*Enzyme Classification*), il nome dell'enzima responsabile della reazione di quello *step* e la sua abbreviazione. In blu è evidenziato la reazione che riguarda l'enzima NAGK. Modificata da Xu *et al.* 2006. (B) Modello schematico della regolazione dell'attività di NAGK attraverso la sua associazione con PII. Un trimero della proteina PII interagisce con un esamero di NAGK inducendo l'attività enzimatica di NAGK in condizioni di presenza di azoto (*N-replete*). In condizioni di carenza di azoto invece (*N-depleted*), PII lega ATP e 2-ossoglutarato, si dissocia da NAGK, portando ad una diminuzione della sua attività. Da Osanai e Tanaka 2007. (C) Interazione tra PII-NAGK e controllo della sintesi dell'Arg nel cianobatterio *S. elongatus*. La conversione dell'N-acetylglutamato (NAG) ad NAG-fosfato, la reazione limitante nel *pathway* di biosintesi dell'Arg, è catalizzata dall'enzima NAGK. L'attività dell'NAGK è controllata dalla formazione del complesso con PII. Quando nella cellula c'è energia sufficiente (eccesso di azoto, bassi livelli di 2-ossoglutarato e di ADP), si forma il complesso PII-NAGK, portando ad un aumento dell'attività catalitica di NAGK e ad una forte riduzione dell'inibizione da *feedback* dell'Arg. Come conseguenza i livelli di Arg nella cellula aumentano e l'Arg può essere usata per la formazione del polimero di riserva di azoto cianoficina. Da Forchhammer 2008. (D) Struttura del complesso PII-NAGK di *S. elongatus*. NAGK, PII e NAG sono mostrati come superficie, nastri e sfere rispettivamente. I dimeri di NAGK e le subunità di PII sono colorati indipendentemente. Vista dal lato citoplasmatico della cellula (a sinistra) e vista dal lato, sullo stesso piano della membrana citoplasmatica (a destra). Da Llacer *et al.* 2007. (E) Modello della struttura a nastro della proteina PII in seguito a regolazione da 2-ossoglutarato. Gli elementi della struttura secondaria sono indicati come $\beta 1$ - $\beta 5$ e $\alpha 1$ - $\alpha 2$; l'ATP ed il 2-ossoglutarato (2-OG) sono indicati con la rappresentazione a bastoncino, mentre il Mg^{2+} è indicato con una piccola sfera verde. Da Fokina *et al.* 2010.

In un recentissimo studio di cristallografia a raggi X sono stati riportati i dettagli della struttura della proteina PII in complesso con ATP, Mg^{2+} e 2-ossoglutarato, che hanno chiarito come il 2-ossoglutarato influenzi l'interazione di PII-NAGK [Fokina *et al.* 2010]. Il sito di legame per il 2-ossoglutarato è localizzato nelle fessure tra due subunità e la base del T-loop. Il 2-ossoglutarato è legato ad uno ione Mg^{2+} e la struttura è stabilizzata da tre gruppi fosfati dell'ATP e dall'interazione ionica con i residui altamente conservati K58 e Q39, oltre all'interazione con B-loop e T-loop. Queste interazioni impongono un'unica conformazione del T-loop che influenza l'interazione delle proteine PII e NAGK (Fig. 15E).

Analisi di *yeast two-hybrid* hanno permesso di identificare un'altra proteina *target* con cui interagisce PII nel Cianobatterio *Synechocystis*: PamA (*PII Associated Membrane Protein A*). PamA è una proteina di 680 aminoacidi che contiene sette probabili domini transmembrana. Analisi filogenetiche ed *in silico* mostrano che la regione C-terminale di PamA contiene la struttura del dominio della famiglia MscS (*Mechanosensitive Channel of Small Conductance*), caratterizzata da canali di membrana che riducono la pressione di turgore causata da shock osmotici nei batteri. Questo suggerisce che PamA sia un canale di membrana regolato da PII. L'interazione tra PII e PamA è abolita in presenza di ATP e 2-ossoglutarato, suggerendo che PII si dissocia da PamA durante condizioni di carenza di azoto (Fig. 16A). Successive analisi genetiche hanno indicato che il livello di PII si riduce nel mutante deficiente per PamA. Inoltre i livelli dei trascritti di un insieme di geni regolati da azoto tra cui *nrtABCD* (codificante per NRT), *nblA* (codificante per una proteina essenziale per la degradazione del ficobilisoma durante condizioni di carenza di azoto) e *sigE* (codificante un fattore σ che regola positivamente l'espressione dei geni del catabolismo degli zuccheri), la cui espressione è sotto il controllo di NtcA, si riduceva nel mutante deficiente per PamA. Questi risultati suggeriscono che PamA *up-regola* geneticamente i livelli di espressione di questi geni regolati da azoto [Osanai e Tanaka 2007].

Infine, un'ultima proteina che interagisce con PII in *Synechococcus* è PipX (*PII Interaction Protein X*), una piccola proteina di 89 aminoacidi. Questa proteina è conservata nei genomi di tutti i cianobatteri determinati fino ad oggi, ma non negli altri batteri e nelle piante. L'interazione tra PII e PipX è indebolita dalla presenza di

ATP e 2-ossoglutarato; inoltre è stato visto che PipX interagisce anche con NtcA e il 2-ossoglutarato facilita la formazione di questo complesso. A differenza di quanto osservato per l'interazione PII-NAGK, l'ADP non ha un effetto negativo sulla formazione del complesso PII-PipX e la mutazione nella Ser⁴⁹ non impedisce il legame [Forchhammer 2008]. PipX interagisce con PII in condizioni di presenza di azoto e si dissocia da PII, associandosi con NtcA, in condizioni di carenza di azoto, permettendo l'attivazione della trascrizione del regulone NtcA (Fig. 16B).

Recenti analisi genetiche con il mutante nullo per PipX hanno dimostrato che PipX inoltre regola positivamente l'attività della nitrato reduttasi, della nitrito reduttasi e della glutammina sintetasi ed è richiesta per l'induzione della clorosi in condizioni di carenza di azoto [Osanai e Tanaka 2007].

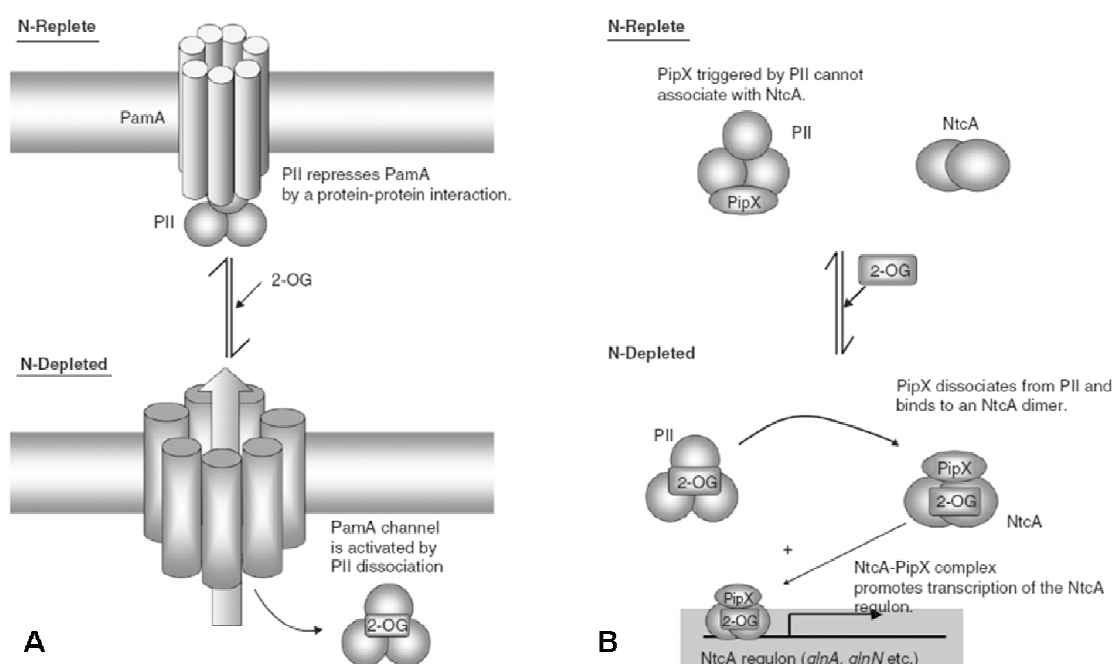


Figura 16: (A) Modello di regolazione della proteina PamA mediante la sua associazione con PII. PII è associata alla regione C-terminale di PamA in condizioni di presenza di azoto (*N-replete*), portando alla chiusura del canale PamA. In condizioni di carenza di azoto (*N-depleted*), PII si lega ad ATP e 2-ossoglutarato, si dissocia da PamA, con conseguente apertura e riattivazione del canale PamA. Si pensa che PamA costituisca un eptamero (in quanto probabile membro della famiglia MscS), ma non è stato ancora dimostrato. (B) Modello per la regolazione del fattore di trascrizione NtcA ad opera di PII e PipX. Un monomero di PipX interagisce con un trimero di PII in condizioni di eccesso di azoto (*N-replete*), ma non con NtcA. PipX si dissocia da PII ed interagisce con NtcA quando si ha un aumento della concentrazione di 2-ossoglutarato a causa di carenza di azoto (*N-depleted*). Si pensa che PipX aumenti l'attività di NtcA, determinando un incremento nella trascrizione del regulone NtcA. Da Osanai e Tanaka 2007.

1.3 Le proteine PII nelle piante: struttura, localizzazione e regolazione

A dispetto della larga caratterizzazione della proteina PII nei batteri, nelle piante superiori, questa proteina è stata identificata solo nel 1998, nella pianta modello *Arabidopsis thaliana*. Da allora, progetti di sequenziamento genomico di organismi eucariotici hanno rivelato la presenza di omologhi della proteina PII anche nelle alghe rosse *Porphyra purpurea* e *P. yezoensis*, nei muschi e nelle alghe verdi come *Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carteri* e *Micromonas pusilla* ed in molte piante superiori, tra cui *Ricinus communis* (ricino), *Oryza sativa* (riso), *Sorghum bicolor* (sorgo), *Pinus pinaster* (pino), *Vitis vinifera* (vite), *Lycopersicon esculentum* (pomodoro) (Fig. 17) [Uhrig *et al.* 2009].

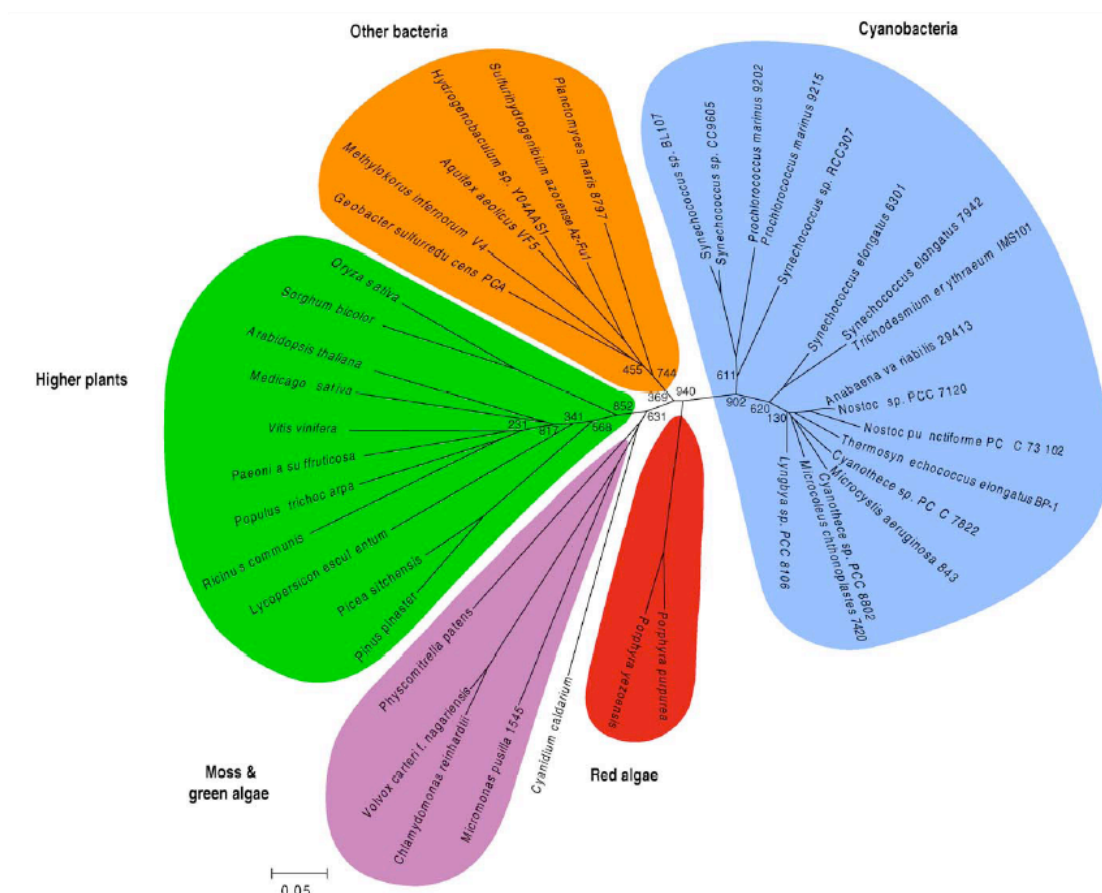


Figura 17: Albero filogenetico ottenuto con il metodo *Neighbor-joining*, usando le sequenze proteiche delle proteine appartenenti alla superfamiglia PII, allineate con CLUSTAL X. I gruppi monofiletici sono classificati secondo colore, con la singola eccezione di una proteina PII delle alghe rosse classificata come “muschio o alghe verdi”. Da Uhrig *et al.* 2009.

Ad oggi sono stati riconosciuti quattro paraloghi dei geni codificanti proteine che appartengono alla superfamiglia PII; questi rientrano nei gruppi GlnB, GlnK, Nifl e PII-NG e sono ben rappresentati nello spettro delle diverse specie procariotiche, mentre, come per quanto visto nei cianobatteri, nelle piante è stato ritrovato solo un singolo omologo del gene che codifica per la proteina PII [Sant'Anna *et al.* 2009]. Le proteine PII di pianta appartengono alla sottofamiglia GlnB e sono strettamente correlate con le proteine GlnB dei cianobatteri. È da notare che le proteine PII di pianta hanno mantenuto 5 dei 14 residui aminoacidici che distinguono le proteine cianobatteriche da tutte le altre proteine dei procarioti. Inoltre la Ser⁴⁹, sito di fosforilazione della proteina GlnB di *S. elongatus*, è conservata nelle proteine di pianta. Un recente studio mostra che sia l'ATP che il 2-ossoglutarato legano la proteina PII di *A. thaliana*, in maniera analoga a quanto avviene per GlnB di *S. elongatus* [Moorhead e Smith 2003]. Tutti questi dati suggeriscono che le proteine vegetali assomiglino moltissimo a quelle cianobatteriche, andando a corroborare l'ipotesi secondo cui il gene di PII negli eucarioti fototrofi provenga da una cellula cianobatterica ancestrale (teoria dell'endosimbiosi) [Forchhammer 2004].

Hsieh e collaboratori nel 1998 per primi hanno identificato e caratterizzato il gene della proteina PII, definito *GLB1*, nelle due piante superiori *A. thaliana* e *R. communis* [Hsieh *et al.* 1998]. Queste due proteine mature mostrano un'elevata identità nella sequenza aminoacidica rispetto alla sequenza delle proteine PII batteriche (Fig. 18A). Allineamenti nelle sequenze di PII di batteri enterici, cianobatteri, archeobatteri e piante (*A. thaliana* e *R. communis*) hanno rivelato un'identità di sequenza intorno al 50%, soprattutto a livello del T-loop. Una regione di elevata similarità è quella compresa tra gli aminoacidi 74 e 186 nella proteina PII di *A. thaliana*. All'interno di questa regione, la sequenza aminoacidica dedotta mostra un'elevata percentuale di identità anche con altri rappresentanti del mondo dei microrganismi: *Synechocystis* sp PCC 6803 (54%); *Synechococcus* (54%); *K. pneumoniae* (50%); *R. leguminosarum* (47%); *B. japonicum* (46%); *A. brasilense* (46%); *R. capsulatus* (46%); *M. thermolithotrophicus* (36%) (Fig. 18B). Una percentuale di identità ancora più elevata (79%) si ottiene in altre due zone della sequenza aminoacidica: il dominio I che comprende anche la Tyr⁵¹ di *E. coli*, ed il dominio II (Fig. 18A). In entrambe le proteine vegetali la Tyr⁵¹ è sostituita con una fenilalanina (Phe), mentre queste proteine conservano la serina

(Ser⁴⁹), che nei cianobatteri viene fosforilata. Inoltre, le sequenze derivate delle proteine PII delle due piante analizzate mostrano un'identità di sequenza del 90% in un'altra regione corrispondente alla regione comune con le proteine microbiche. Infine, l'identità tra queste due proteine di pianta si riduce drasticamente nella parte N-terminale (Fig. 18C) [Hsieh *et al.* 1998].

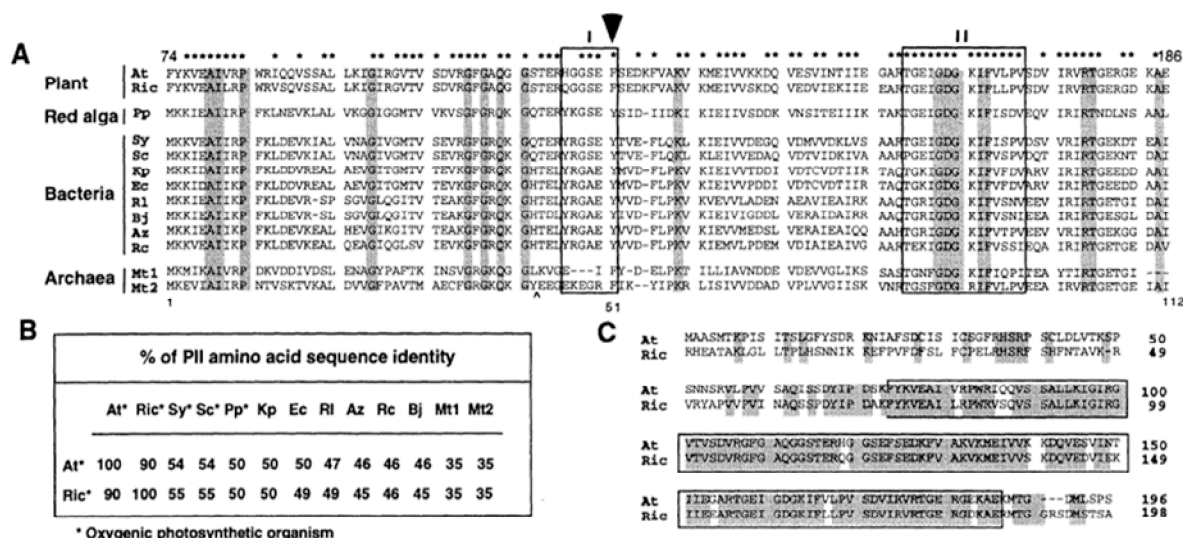


Figura 18: (A) Comparazione delle sequenze aminoacidiche dedotte dei polipeptidi PII-like batterici e vegetali. I residui aminoacidici conservati in tutte le proteine sono ombreggiati. Gli asterischi (*) indicano i residui conservati tra le proteine delle piante ed alcune proteine batteriche. Le zone nei due riquadri indicano il dominio I ed il dominio II. La posizione del residuo di tirosina che in *E. coli* è uridililata (Tyr⁵¹), compresa nel dominio I, è indicata con una freccia nera. At, *A. thaliana*; Ric, *R. communis*; Pp, *P. purpurea*; Sy, *Synechocystis* sp PCC 6803; Sc, *Synechococcus*; Kp, *K. pneumoniae*; Ec, *E. coli*; Rl, *R. leguminosarum*; Bj, *B. japonicum*; Az, *A. brasilense*; Rc, *R. capsulatus*; Mt, *M. thermolithotrophicus*. (B) La percentuale di identità delle sequenze aminoacidiche dedotte delle proteine PII procariotiche e di pianta. (C) Comparazione delle sequenze aminoacidiche dedotte delle proteine PII delle piante *A. thaliana* e *R. communis*. I residui aminoacidici identici sono ombreggiati. Le regioni nei riquadri corrispondono alle proteine PII dei procarioti. Da Hsieh *et al.* 1998.

È interessante notare la presenza di un certo numero di residui aminoacidici, tra cui il Trp²², l'Arg³⁷ e Asp⁶⁵, che sono altamente conservati nelle piante ma differiscono negli eubatteri, negli archeobatteri e nelle alghe rosse. Questi residui sono localizzati sulla superficie del trimero vicino al T-loop e, probabilmente, partecipano alle interazioni inter-molecolari pianta-specifiche (Fig. 19).

Strutturalmente la proteina PII delle piante superiori è una proteina omo-trimerica altamente conservata di circa 45 kDa, filogeneticamente molto vicina alla proteina GlnB dei cianobatteri [Mizuno *et al.* 2007a].

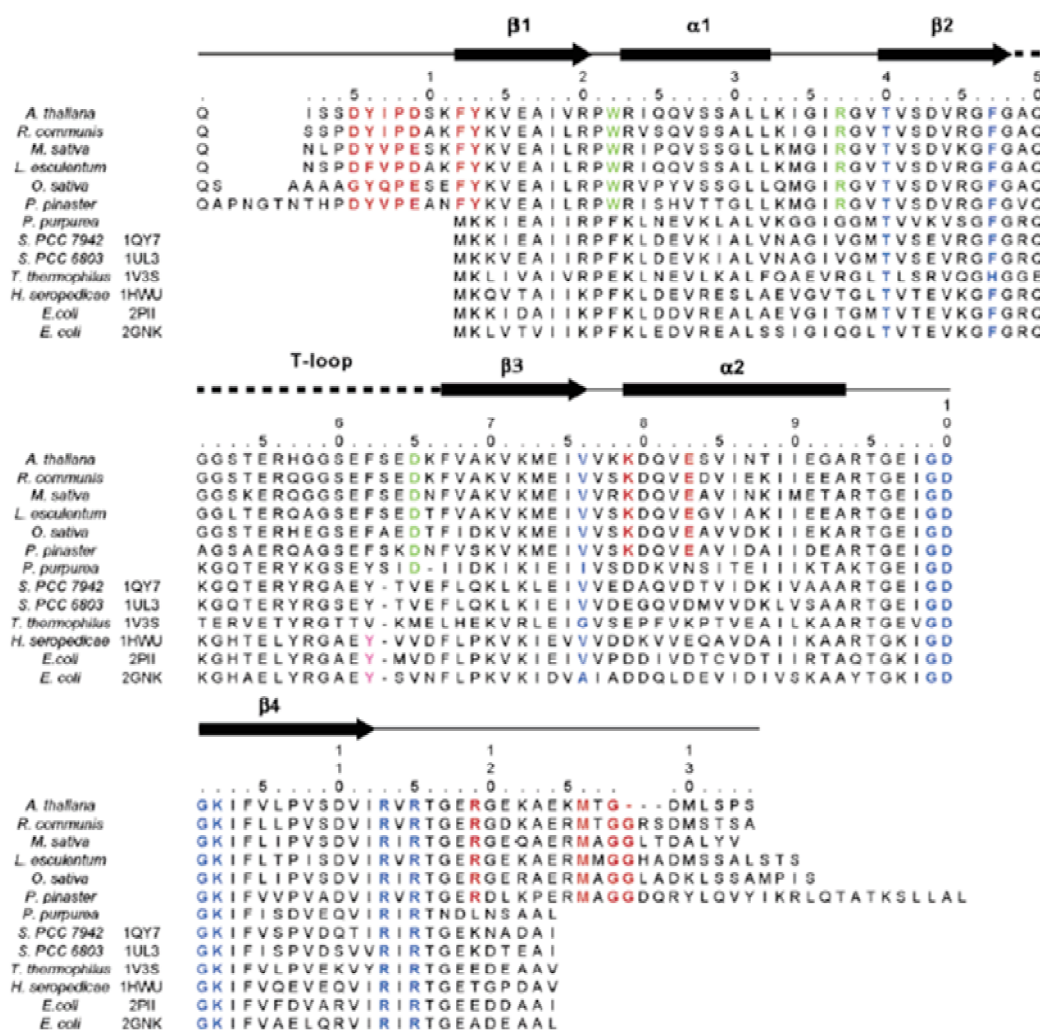


Figura 19: Allineamento delle sequenze di PII delle piante (*Arabidopsis thaliana*, *Ricinus communis*, *Medicago sativa*, *Lycopersicon esculentum*, *Oryza sativa* e *Pinus pinaster*), delle alghe rosse (*Porphyra purpurea*), dei cianobatteri (*Synechococcus* sp. PCC 7942 e *Synechocystis* sp. PCC 6803), archeobatteri (*Thermus thermophilus*) ed altri batteri (*Herbaspirillum seropedicae*, *Eschericia coli* GlnB -indicata in figura come 2PII- e GlnK -indicata in figura come 2GNK). I residui, interni e che appartengono all'N-ter e al C-ter, che sono altamente conservati e specifici per le piante sono indicati in rosso. Quelli pianta-specifici altamente conservati che differiscono da quelli trovati in archeobatteri, eubatteri ed alghe rosse sono colorati in verde. I residui altamente conservati coinvolti nel legame con l'ATP sono invece colorati in blu. Infine i residui di tirosina che sono uridililati nel T-loop della proteina di *E. coli* e *H. seropedicae* sono colorati in lilla. Da Mizuno *et al.* 2007a.

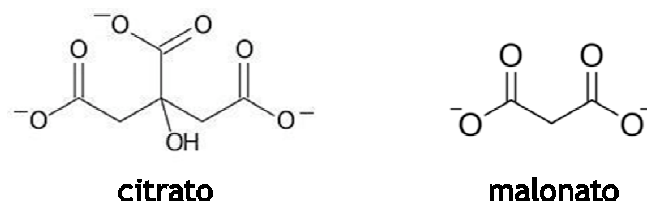
Anche studi successivi a quello di Hsieh e collaboratori nel 1998 confermano un altissimo livello di conservazione per una regione centrale comprendente il motivo del T-loop, fondamentale per l'interazione con i *partner* proteici (Fig. 20A). Sono invece presenti solo in cianobatteri e piante un singolo aminoacido del B-loop (glutammato) e diversi aminoacidi del T-loop, caratterizzati per essere importanti per l'interazione con la proteina chinasi NAGK (N-acetil-glutammato chinasi) [Mizuno *et al.* 2007b]. Inoltre esclusive caratteristiche delle alghe verdi e delle piante superiori

sono dei domini aggiuntivi di 13-15 residui aminoacidici all'estremità N-terminale e C-terminale ed un segnale di localizzazione cloroplastidiale (cTP, *chloroplast transit peptide*). Quest'ultimo, consente la traslocazione della proteina nel cloroplasto e viene poi rimosso per generare la forma matura della proteina [Moorhead e Smith 2003]. Infatti sia nelle alghe verdi che nelle piante superiori la proteina PII è codificata nel nucleo, ma è traslocata successivamente all'interno del cloroplasto, a differenza di quanto accade per le alghe rosse, in cui PII è codificata direttamente dal genoma cloroplastidico [Sugiyama *et al.* 2004]. La diretta evidenza della sua localizzazione nei cloroplasti/plastidi è stata ottenuta monitorando al microscopio confocale foglie di *O. sativa* (riso) che esprimevano la proteina di fusione OsGlnB:sGFP (ottenuta fondendo in frame l'intera ORF, *open reading frame*, del gene *OsGlnB* senza codone di STOP con il gene della GFP, sotto la guida del promotore CaMV35S, *cauliflower mosaic virus*, virus del mosaico del cavolfiore). Il segnale di questa proteina di fusione co-localizzava con l'autofluorescenza dei cloroplasti confermando la sua presenza in questo compartimento cellulare (Fig. 20B). Uno stesso esperimento effettuato con la proteina di fusione OsNAGK1:sGFP ha confermato anche per la proteina NAGK di *O. sativa* la sua localizzazione nei cloroplasti (Fig. 20C) [Sugiyama *et al.* 2004].

Studi cristallografici hanno consentito di identificare la struttura quaternaria delle proteine PII di pianta [Mizuno *et al.* 2007a]. È stato quindi possibile distinguere una "superficie A" ed una "superficie B" (Fig. 20D-E). L'N-terminale, di 13 aminoacidi, forma una struttura compatta e ben ordinata sulla "superficie B" del trimero e potrebbe essere coinvolta nell'interazione proteina-proteina; i T-loop formano invece la superficie "A"; infine le estensioni C-terminali pianta-specifiche occupano i siti di legame per l'ATP e potrebbero essere importanti per i cambi conformazionali della proteina in risposta al legame con questa molecola [Mizuno *et al.* 2007a]. Nonostante la funzione di queste regioni di estensione non siano state ancora comprese, l'elevato livello di conservazione e la localizzazione così esposta di queste regioni adiacenti ai siti di legame per l'ATP, suggeriscono che potrebbero essere responsabili nell'interazione con altre proteine [Uhrig *et al.* 2009].

Anche le proteine di pianta sono costituite da tre subunità di circa 15 kDa; ogni subunità è composta da un doppio motivo $\beta\alpha\beta$ in cui i quattro foglietti- β antiparalleli sono vicini alle due α -eliche. Inoltre il margine di ogni foglietto- β è appaiato con il

marginale del foglietto- β della subunità adiacente; questo comporta la formazione di una struttura del *core* centrale “a barile” che fornisce da piattaforma alle due superfici A e B. La proteina PII di *A. thaliana* è stata cristallizzata in presenza di elevate concentrazioni di citrato o malonato (Fig. 20D) [Mizuno *et al.* 2007a].



Sebbene la rilevanza fisiologica di questo legame non sia chiara, sembra che questi anioni polivalenti siano inibitori competitivi per il sito di legame dell'ATP.

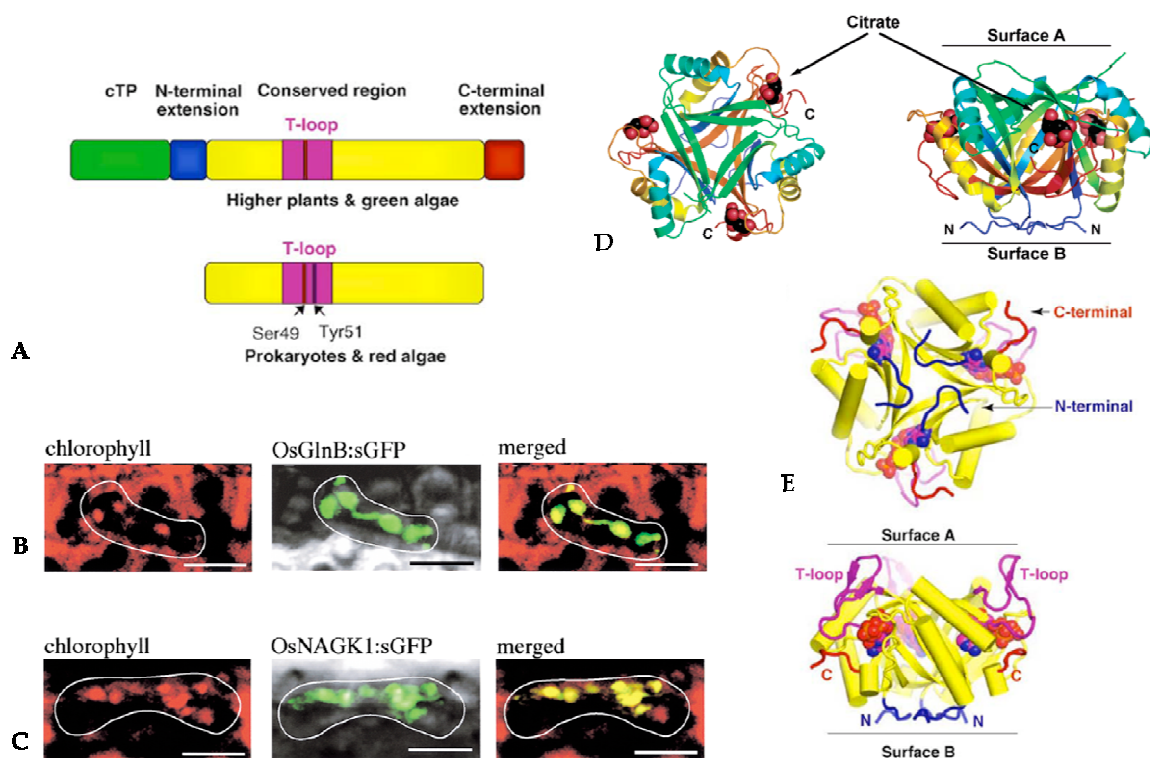


Figura 20: (A) Rappresentazione schematica dei domini strutturali della proteina PII in diversi organismi procarioti ed eucarioti. Sono indicate: la regione centrale (gialla), il T-loop (lilla), i domini aggiuntivi di 13-15 residui aminoacidici all'estremità N-terminale e C-terminale (in blu ed in rosso rispettivamente) ed il segnale di localizzazione cloroplastidiale (cTP, *chloroplast transit peptide*, in verde). In basso è schematizzata la posizione delle Ser⁴⁹ e Tyr⁵¹ all'interno del T-loop. Da Uhrig *et al.* 2009. (B-C) Analisi al microscopio confocale dell'espressione transiente delle proteine di fusione OsGlnB:sGFP (B) o OsNAGK1:sGFP (C) in foglie di riso. Le immagini a sinistra indicano quelle ottenute dall'autofluorescenza della clorofilla nei cloroplasti; le immagini centrali indicano la fluorescenza della GFP; le immagini a destra indicano la sovrapposizione delle due fluorescenze che sono co-localizzate. Da Sugiyama *et al.* 2004. (D) Diagramma di *Ribbon* (rappresentazione schematica in 3D della struttura) della proteina PII di *A. thaliana* che lega il citrato. L'N-terminale è colorato in blu, il C-terminale in rosso ed il citrato è indicato con la rappresentazione a sfere. Da Mizuno *et al.* 2007a. (E) Diagramma di *Ribbon* dell'omo-trimero della proteina PII di *A. thaliana*. Sono evidenziati i T-loop (in lilla), le estremità N-terminali (in blu) e quelle C-terminali (in rosso). L'ATP è mostrato con il modello a sfere da riempire (cpk). Da Uhrig *et al.* 2009.

Come precedentemente riportato, alcuni aminoacidi chiave nel T-loop subiscono delle modifiche *post*-traduzionali per regolare l'attività delle proteine PII in seguito a variazioni delle condizioni metaboliche. Gli esempi più caratterizzati sono la Ser⁴⁹ di *S. elongatus* e la Tyr⁵¹ di *E. coli*, diventati rispettivamente la Ser⁶⁰ e la Phe⁶² in *A. thaliana* [Forchhammer 2008]. A dispetto della conservazione della Ser⁶⁰ nelle piante superiori, esperimenti con *A. thaliana* usando radioisotopi marcati ed anticorpi specifici per il fosforo non hanno rilevato alcuna fosforilazione sulla Ser⁶⁰ del T-loop in diverse condizioni fisiologiche [Smith *et al.* 2004]. Gli autori comunque sostengono che le condizioni ottimali per la fosforilazione in pianta potrebbero non essere state raggiunte. In alternativa, potrebbe essere che le piante abbiano perso, durante l'evoluzione, il meccanismo cellulare (PII chinasi/PphA fosfatasi) richiesto per la fosforilazione. Il secondo aminoacido chiave è la Tyr⁵¹. Nonostante quest'ultimo sia altamente conservato nei procarioti, nelle piante è sempre sostituito da una fenilalanina (Phe⁶²) che non è soggetta a uridililazione.

Non ci sono quindi evidenze al momento che indichino quel tipo di controllo *post*-traduzionale della proteina PII nelle piante superiori. Se questo è vero e tali meccanismi si sono persi nel corso dell'evoluzione, come viene regolata allora PII nelle piante?

Similarmente a quanto avviene nei procarioti, la PII delle piante superiori lega ATP o ADP e 2-ossoglutarato con elevata affinità, divenendo un possibile sensore del carbonio all'interno dei cloroplasti. Sebbene l'ATP leghi la proteina PII anche in assenza di 2-ossoglutarato, in presenza di questa molecola segnale, l'affinità per l'ATP aumenta [Moorhead e Smith 2003]. A prescindere dai livelli di 2-ossoglutarato, le costanti di legame dell'ATP sono ben al di sotto della concentrazione di ATP nei cloroplasti, suggerendo che, nelle piante, PII sia sempre legato all'ATP [Smith *et al.* 2003]. Inoltre le proteine PII in pianta legano 2-ossoglutarato solo quando sono già legate all'ATP; al pari, l'ADP può legare le proteine PII, ma l'affinità di legame si riduce in presenza di 2-ossoglutarato [Moorhead e Smith 2003]. Anche nelle piante superiori quindi l'attività di PII può essere regolata dal legame di queste molecole effettrici.

Nel caso delle piante però è stato visto che la regolazione potrebbe avvenire soprattutto a livello trascrizionale. Hsieh e collaboratori hanno dimostrato che la luce

può indurre variazioni nei livelli di trascritto del gene di PII nella pianta modello *A. thaliana* cresciuta *in vitro* (Fig. 21A-B). Poiché è noto che la luce coordina l'espressione dei geni di assimilazione dell'azoto, tra cui quelli che codificano per la nitrato reductasi, la glutammina sintetasi e la glutammato sintasi con quella dei geni della fotosintesi, come il gene codificante per la piccola subunità della Rubisco (*rbcS*), sono stati fatti degli esperimenti per verificare se la luce potesse regolare anche l'accumulo dell'mRNA di *GLB1* in *A. thaliana* [Hsieh *et al.* 1998]. Analisi di *Northern blot* mostrano che l'mRNA di *GLB1* si accumula preferenzialmente nelle piante cresciute alla luce piuttosto che nelle piante adattate a crescere al buio per 48 ore (Fig. 21A). È stato quindi effettuato un esperimento di *Time Course*, per vedere se e quanto l'espressione di *GLB1* si incrementasse in presenza della luce. Il risultato dimostrava che i livelli di mRNA di *GLB1* erano molto bassi nelle piante adattate al buio; erano rapidamente indotti dopo 1 ora di trattamento alla luce ed arrivavano ad un livello massimo a 8-16 ore, mantenendo questo livello anche dopo 24-48 ore in piante in cui veniva annullato il normale ciclo giorno/notte ed erano mantenute alla presenza di luce per due giorni (Fig. 21B).

Inoltre, gli stessi autori hanno dimostrato che la quantità di trascritto di PII dipendeva anche dai livelli di saccarosio e di diversi aminoacidi. Il saccarosio produceva un effetto di incremento nei livelli di trascritto di PII, sia in condizioni di buio che di luce (Fig. 21B-D). Gli aminoacidi avevano invece un effetto di soppressione in quanto, l'aggiunta degli aminoacidi asparagina, glutammina e glutammato, determinava la riduzione dell'attivazione trascrizionale di PII indotta dalla luce (Fig. 21C-D). Inoltre, l'effetto additivo della combinazione luce-saccarosio non era osservato usando la combinazione luce-mannitolo (una risorsa di carbonio non metabolizzabile), indicando che l'induzione dell'mRNA di *GLB1* non era dovuta completamente al ciclo luce/buio legato al ciclo circadiano o ad un effetto osmotico, ma probabilmente all'accumulo di prodotti della fotosintesi che sono legati alla presenza della luce [Hsieh *et al.* 1998].

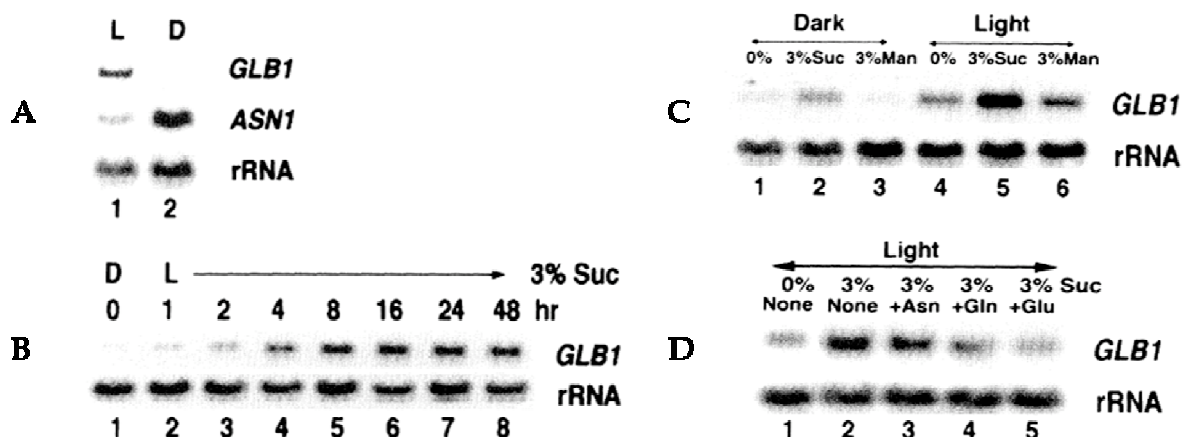


Figura 21: Analisi *Northern blot* effettuata su RNA estratto da piantine di *A. thaliana* cresciute in diverse condizioni. (A) Espressione indotta dalla luce del gene *GLB1* di *A. thaliana*. Le piantine sono state cresciute per 16 giorni in normale ciclo giorno notte (16h luce e 8h buio) e poi mantenute per 48h alla luce (L, pozzetto 1) o al buio (D, pozzetto 2). *ASN1* è il gene codificante per l'asparagina sintetasi, usata come controllo nel trattamento luce verso buio. (B) Effetto della luce sull'induzione del trascritto di *GLB1* in un esperimento di *Time course*. Le piante cresciute per 16 giorni in un normale ciclo giorno-notte sono state trasferite su un mezzo contenente 3% di saccarosio al buio per due giorni e poi esposte alla luce per 1h, 2h, 4h, 8h, 16h, 24h e 48h (pozzetti da 2 a 8). (C) L'espressione del gene *GLB1* è regolata dai metaboliti. Le piante di 16 giorni sono state mantenute al buio (pozzetti 1-3) o alla luce (pozzetti 4-6) per due giorni. Sia alle piante cresciute al buio che a quelle cresciute alla luce (pozzetti 1, 4) è stato aggiunto 3% saccarosio (pozzetti 2, 5) o mannitolo (pozzetti 3, 6). (D) Effetto di riduzione dell'mRNA di *GLB1* in presenza di aminoacidi aggiunti al mezzo di crescita. Piantine di 16 giorni sono state trattate alla luce per 48h in un mezzo di coltura MS contenente: nessun aminoacido e 0% saccarosio (pozzetto 1), nessun aminoacido e 3% saccarosio (pozzetto 2), 3% saccarosio e 0,4 mM Asn (pozzetto 3), 3,4 mM Gln (pozzetto 4) o 3mM Glu (pozzetto 5). In tutti gli esperimenti di *Northern blot*, è stato usato come controllo l'rRNA 18S. Da Hsieh *et al.* 1998.

Successivamente Ferrario-Mery e collaboratori hanno pubblicato dati in contraddizione con quelli appena riportati, in cui si indicava che i livelli di espressione di PII nelle foglie di *A. thaliana* non sono influenzati né dal ciclo giorno-notte né dalla disponibilità di azoto [Ferrario-Mery *et al.* 2005]. Analisi di *Real Time RT-PCR* e *Western Blot* usando anticorpi purificati per la proteina PII, mostrano che il livello dei trascritti di *AtGLB1* in piante cresciute su un mezzo ricco di azoto (10 mM NO_3^- e 2 mM NH_4^+) sono stabili durante l'intero ciclo giorno/notte eccetto per un piccolo incremento alla fine del giorno (16h) (Fig. 22A). Questo incremento comunque non si riflette in un aumento del livello della proteina PII che resta costante per tutto il periodo temporale (Fig. 22B). Inoltre i livelli di trascritto di *AtGLB1* non variano significativamente né dopo 5 giorni di crescita delle piante in carenza di azoto, né dopo altri 4 giorni di crescita successivi all'aggiunta di azoto sotto forma di nitrato (1 mM o 10 mM) o ammonio (1 mM o 5 mM) (Fig. 22C). In

accordo con questo dato della *Real Time* RT-PCR, i livelli proteici di PII non variano in queste stesse condizioni di crescita (Fig. 22D).

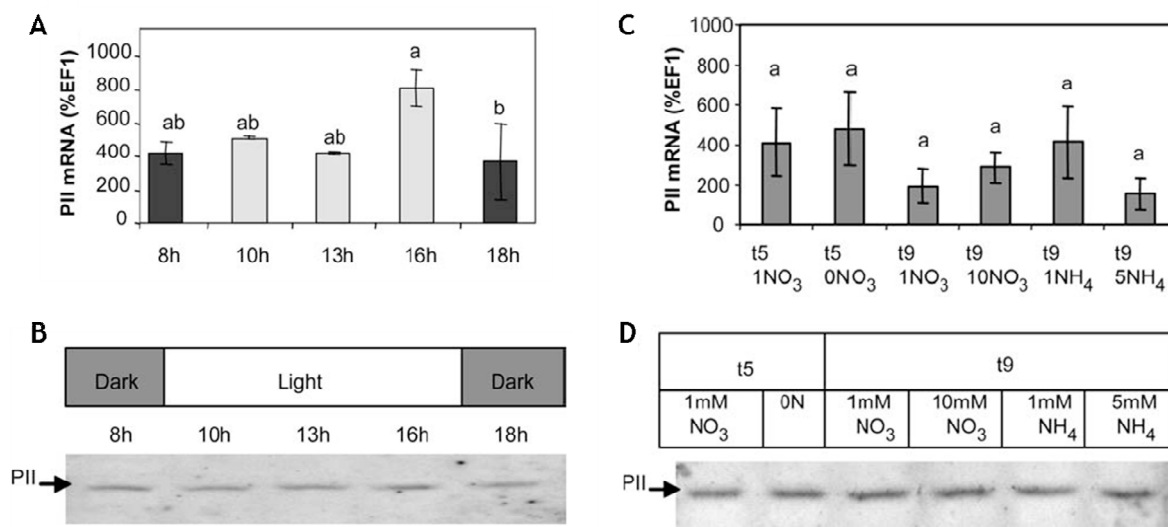


Figura 22: Espressione di *AtGLB1* in piante di *A. thaliana* (ecotipo Wassilewskija) durante il ciclo giorno-notte (A-B) e in funzione di differenti fonti e concentrazioni di azoto (C-D). Nel primo caso (A-B) le piantine sono state cresciute su un mezzo completo e l'RNA e le proteine sono state estratte alla fine e all'inizio del periodo di buio (8h, 18h) e all'inizio, a metà e alla fine del periodo di luce (10h, 13h, 16h). Nel secondo caso (C-D) le piantine sono state cresciute in coltura idroponica con 1 mM NO₃⁻ per 5 settimane (t5 1NO₃), prima di essere sottoposte a 5 giorni di privazione d'azoto (t5 0 N), con successivo trasferimento in presenza di azoto sottoforma di 1 mM NO₃⁻ (t9 1NO₃), 10 mM NO₃⁻ (t9 10NO₃), 1 mM NH₄⁺ (t9 1NH₄) o 5 mM NH₄⁺ (t9 5NH₄) per altri 4 giorni. (A-C) Analisi *Real Time* RT-PCR dei livelli di trascritto di PII. (B-D) Analisi mediante *Western blot* dei livelli proteici di PII usando anticorpi specifici per questa proteina. Da Ferrario-Mery *et al.* 2005.

Studi preliminari effettuati sulla pianta leguminosa modello *Lotus japonicus*, nel laboratorio in cui ho svolto il mio progetto di dottorato, mostrano la presenza di un ortologo della proteina PII anche nel genoma di questa pianta. Il locus genomico consiste in otto esoni separati da sette introni con una struttura identica a quella identificata in *A. thaliana* [D'Apuzzo *et al.* manoscritto in preparazione]. Usando il metodo UPGMA (*Unweighted-Pair-Group Method with Arithmetic Mean*) è stato disegnato un albero filogenetico basato sull'allineamento della sequenza aminoacidica conservata e dedotta delle proteine PII. Quest'analisi ha confermato le relazioni tassonomiche riportate in letteratura [Uhrig *et al.* 2009] ed ha permesso l'identificazione, tra le proteine PII di pianta, di un gruppo di sequenze di proteine delle leguminose che formano un *clade* distinto (Fig. 23A). Inoltre è stato visto per qRT-PCR che la distribuzione del trascritto di *GLB1* di *L. japonicus*, non varia

significativamente tra radici, foglie e noduli maturi di piante cresciute su un mezzo Gamborg-B5 (24 mM KNO₃, 1 mM (NH₄)₂SO₄) o un mezzo derivato dal B5 e privo di risorse di N (Fig. 23B). Un'ulteriore analisi è stata effettuata per valutare il profilo di espressione del gene *GLB1* durante il ciclo giorno/notte (8h/16h) in piante di *L. japonicus* cresciute in coltura idroponica. Un rapido incremento del trascritto si può osservare in radici dopo 3 ore dall'inizio del periodo di luce con una quantità di trascritto che resta costante fino alla fine del periodo di luce e comincia a ridursi dopo due ore al buio (Fig. 23C). Un simile *trend* di regolazione trascrizionale si osserva anche nelle foglie nelle stesse condizioni sperimentali (Fig. 23D). Comunque l'effetto della luce sul trascritto di *GLB1* può essere ottenuto sia nelle foglie che nelle radici, alla fine del periodo di buio, anche con l'aggiunta di 3% saccarosio indicando che in *L. japonicus* l'effetto della luce sulla trascrizione di questo gene è mediato dai prodotti della fotosintesi (Fig. 23C-D). Il profilo di espressione di *GLB1* è stato esaminato anche in piante cresciute in coltura idroponica per due settimane in un mezzo con sufficiente regime azotato (1 mM NH₄NO₃) e successivamente trasferite su un mezzo privo di azoto. In queste condizioni si ha una veloce *down*-regolazione del gene di circa 4 volte, mantenuta almeno fino a 72h dopo lo spostamento (Fig. 23E). Inoltre, la quantità di trascritto nelle radici aumenta nuovamente nelle piante mantenute su un terreno privo di azoto per 5 giorni e questo è consistente con i dati riportati in *A. thaliana*, in cui il livello di trascritto di *GLB1*, analizzato solo su piante mantenute per 5 giorni su un substrato privo di N, non varia significativamente [Ferrario-Mary *et al.* 2005]. Infine, è stata confermata la localizzazione subcellulare della proteina PII nei cloroplasti delle cellule di foglia, anche nella pianta modello *L. japonicus*, fondendo la regione C-terminale della proteina priva del codone di STOP, con la GFP (*Green Fluorescent Protein*), sotto il controllo del promotore CAMV35S [D'Apuzzo *et al.* manoscritto in preparazione]. Questo tipo di analisi è stato anche confermato in radici transgeniche (*hairy roots*) ottenute mediante infezione con *A. rhizogenes* e co-trasformate con due T-DNA contenenti la fusione *GLB1:GFP* e quella *AtrecA-DsRed2*, contenente un peptide che localizza sui plastidi, fuso alla RFP (*Red Fluorescence Protein*). Le radici ottenute sono state osservate al microscopio confocale ed è stata osservata una perfetta sovrapposizione della fluorescenza della GFP e della RFP, con *spot* gialli di fluorescenza, che indicano una precisa ed effettiva co-

localizzazione delle due proteine a livello plastidiale (Fig. 23F) [D'Apuzzo *et al.* manoscritto in preparazione].

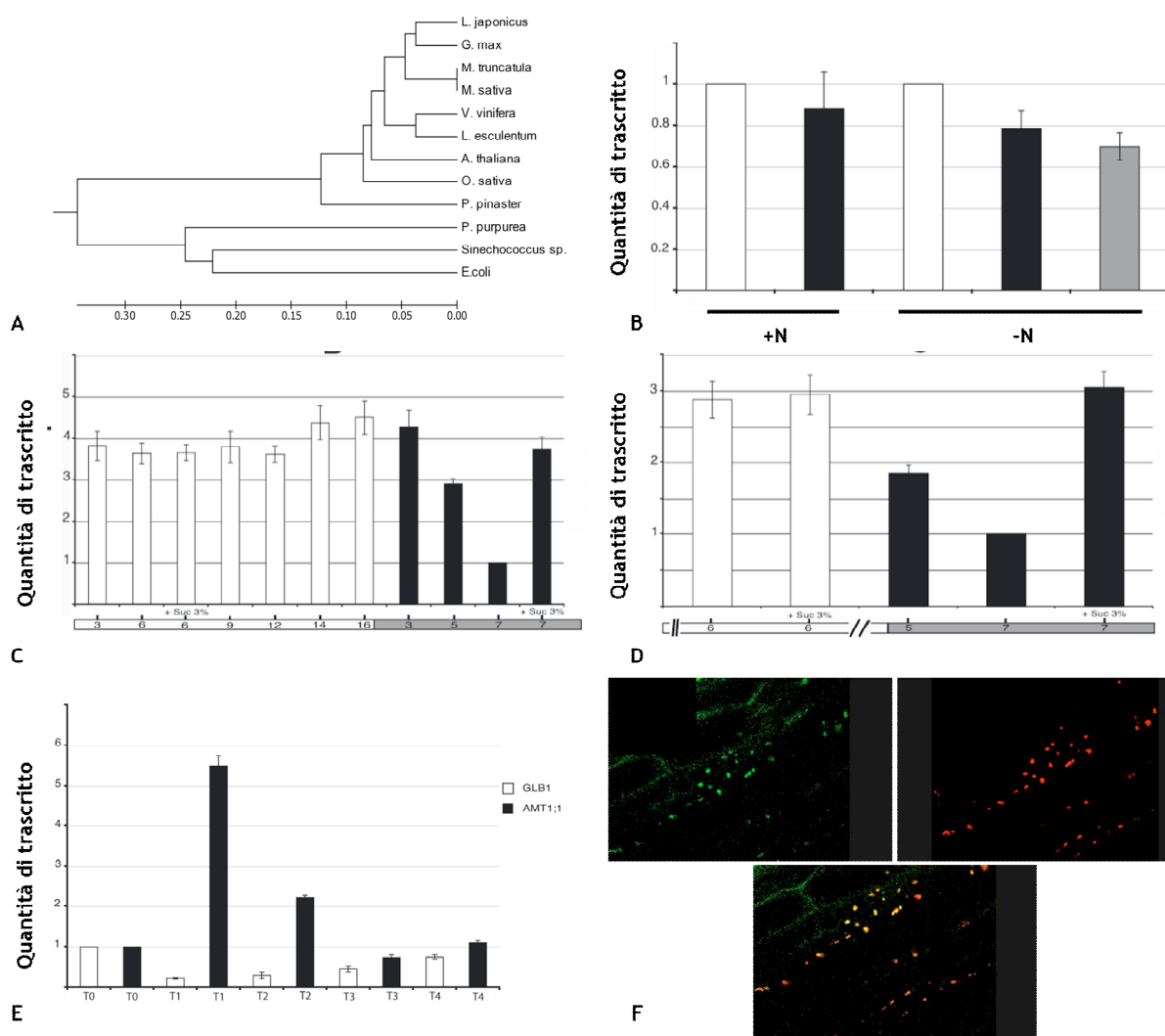


Figura 23: Analisi della proteina PII in *Lotus japonicus*. (A) Albero filogenetico ottenuto analizzando le sequenze delle proteine PII. (B) Analisi qRT-PCR del profilo di espressione di *LjGLB1* in radici (barre bianche), foglie (barre nere) e noduli maturi (barre grigie) di piante cresciute su un mezzo Gamborg-B5 (24 mM KNO₃, 1 mM (NH₄)₂SO₄) o un mezzo derivato da B5 privo di risorse di N. (C-D) Analisi del profilo di espressione del gene *GLB1* durante il ciclo giorno (barre bianche)/notte (barre nere) in radici (C) e foglie (D) di piante di *L. japonicus* cresciute in coltura idroponica. I numeri sull'asse delle ascisse indicano le ore di trattamento. L'aggiunta di 3% saccarosio è indicata. (E) Analisi dell'espressione di *GLB1* in varie condizioni azotate. Le piante di *L. japonicus* sono state cresciute in colture idroponiche in presenza di NH₄NO₃ 1mM, e successivamente trasferite per diverso tempo in un mezzo di crescita privo di azoto. T0; T1: 24h; T2: 48h; T3: 72h; T4: 5giorni. Come controllo delle condizioni sperimentali è stato usato il trasportatore dell'ammonio *LjAMT1;1*, che come atteso, era indotto fortemente nello spostamento da mezzo contenente N a mezzo privo di N (T1). (F) Analisi al microscopio confocale di radici co-trasformate con le fusioni *GLB1::GFP* e *AtRecA::DsRed*. In alto a sinistra: fluorescenza emessa dalla GFP; in alto a destra: fluorescenza emessa dalla RFP; in basso: immagine risultante dalla sovrapposizione delle prime due. Da D'Apuzzo *et al.* manoscritto in preparazione.

1.4 Ruolo della proteina PII in pianta. Caratterizzazione fenotipica dei mutanti

Dato il ruolo centrale delle proteine PII di integrare il metabolismo di azoto e carbonio e la sua conservazione tra procarioti ed eucarioti fototrofi, non sorprende che PII abbia evoluto diversi meccanismi per interagire con un gran numero di proteine *target*, che le consentissero di esercitare il suo effetto di regolazione anche in organismi tanto diversi [Uhrig *et al.* 2009]. Come descritto nei paragrafi precedenti, le prime proteine *target* di PII sono state identificate in *E. coli* e sono coinvolte nella regolazione dell'attività della GS e nella trascrizione dei geni legati al metabolismo dell'azoto. Stranamente però ortologhi di queste proteine, NtrB e GlnE, non esistono in pianta.

Le prime evidenze sulle possibili proteine *target* della proteina PII di pianta e su possibili ruoli esercitati nella regolazione del metabolismo azotato e carbonioso risalgono ad un articolo del gruppo di G. Coruzzi [Hsieh *et al.* 1998]. Piante cresciute in presenza di saccarosio ma senza alcuna fonte azotata accumulano dei pigmenti definiti antocianine assumendo diversi tipi di colorazione. Questo processo può essere compensato ed invertito dall'aggiunta nel mezzo di crescita di azoto inorganico o glutammina [Hsieh *et al.* 1998]. Piante transgeniche di *A. thaliana* over-esprimenti il gene di PII accumulavano antocianine quando cresciute su un mezzo contenente sufficiente saccarosio, ma privo di fonti azotate, allo stesso modo di una pianta *wild type*. Questo accumulo di antocianine era attenuato nelle piante transgeniche di *A. thaliana* dall'aggiunta di azoto inorganico, ma non da quella di glutammina, indicando l'incapacità di queste piante di percepire e/o metabolizzare questo aminoacido [Hsieh *et al.* 1998]. Già questi studi iniziali sembravano suggerire una funzione della PII delle piante analoga a quella dei procarioti, nel *sensing* e/o trasduzione del segnale C/N. Sembra però che le proteine PII nel regno dei vegetali abbiano evoluto un ruolo secondario e più specializzato rispetto a quanto non avvenga nei procarioti [Moorhead e Smith 2003].

Studi effettuati usando mutanti *knockout* inserzionali con T-DNA di *A. thaliana* non hanno mostrato alcun fenotipo alterato nella crescita o nello sviluppo della pianta (Fig. 24D), suggerendo che le proteine PII non giochino un ruolo cruciale e centrale

nelle piante [Ferrario-Mery *et al.* 2005]. Il mutante definito PIIV1, presentava una doppia inserzione del T-DNA nella regione del 3'-UTR (3'-UnTranslated Region) del gene *AtGLB1*, 193 bp a valle del codone di STOP della sequenza codificante. Il mutante definito PIIS2, mostrava la doppia inserzione del T-DNA nel quarto introne dello stesso gene, 953 bp a valle del codone di inizio ATG (Fig. 24A). Analisi di *Real Time* RT-PCR mostravano che i due mutanti presentavano rispettivamente l'85% e il 100% della riduzione dei livelli di trascritto di *AtGLB1* (Fig. 24B). Inoltre analisi di *Western blot* mostravano che la proteina PII non era rilevabile in entrambi i mutanti PIIV1 e PIIS2 (Fig. 24C).

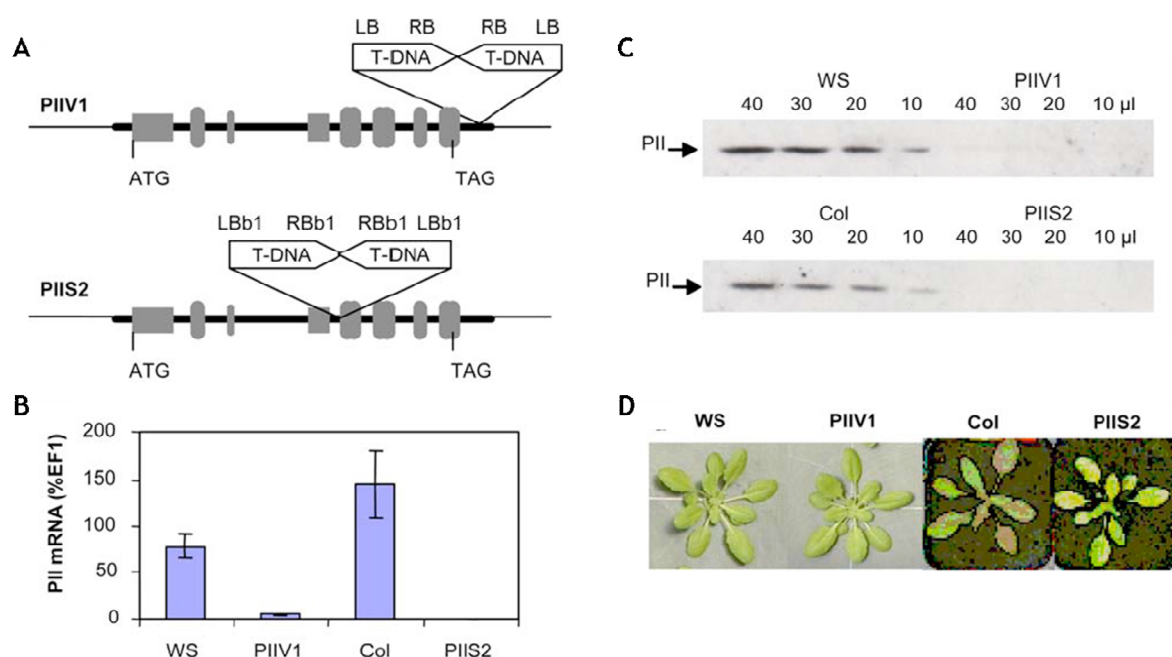


Figura 24: (A) Rappresentazione schematica della struttura dell'inserzione del T-DNA in *AtGLB1*, nelle linee mutanti PIIV1 e PIIS2. (B) Quantizzazione dei livelli di trascritto di *AtGLB1* mediante analisi di *Real time* RT-PCR, nelle piante di *A. thaliana wild type* (ecotipo Wassilewskija), nel mutante PIIV1, nel *wild type* (ecotipo Columbia) e nel mutante PIIS2. (C) Analisi *Western blot* del livello proteico di PII usando anticorpi specifici per PII. (D) Foto della crescita delle piantine di *A. thaliana wild type* (ecotipo Wassilewskija), mutante PIIV1, *wild type* (ecotipo Columbia) e mutante PIIS2. Le piantine sono state cresciute per 5 settimane su un mezzo contenente 10 mM NO_3^- e 2 mM NH_4^+ . Da Ferrario-Mery *et al.* 2005.

Comunque, la caratterizzazione fenotipica di questi mutanti indicava una maggiore sensibilità al nitrito se comparati alle piantine *wild type*. La sensibilità si rifletteva in una ridotta crescita che era correlata alla concentrazione di nitrito nel mezzo (Fig. 25A). In successivi esperimenti per quantificare la limitazione dello sviluppo dovuta alla tossicità da nitrito nei mutanti PIIV1 e PIIS2, le piante sono state caratterizzate

relativamente a tre distinti stadi di sviluppo. Lo stadio A comprendeva semi non germinati (Fig. 25B); lo stadio B comprendeva plantule arrestate nella crescita con cotiledoni clorotici (Fig. 25C); lo stadio C comprendeva infine plantule con cotiledoni e piccole foglie verdi (Fig. 25D). Nei due mutanti di PII, il numero di piante bloccate allo stadio A era più alto a 15 mM NO_2^- (Fig. 25B) mentre il numero di piante bloccate allo stadio B era più alto a 10 mM NO_2^- (Fig. 25C-D). La tossicità al nitrito sembra essere correlata all'accumulo di nitrito nelle plantule (Fig. 25E). Nei mutanti infatti è stato misurato un maggior accumulo di nitrito rispetto al *wild type* cresciuto nelle stesse condizioni (l'effetto era più pronunciato a 10 mM di nitrito per PIIS2 e 12.5 mM di nitrito per PIIV1) [Ferrario-Mery *et al.* 2005].

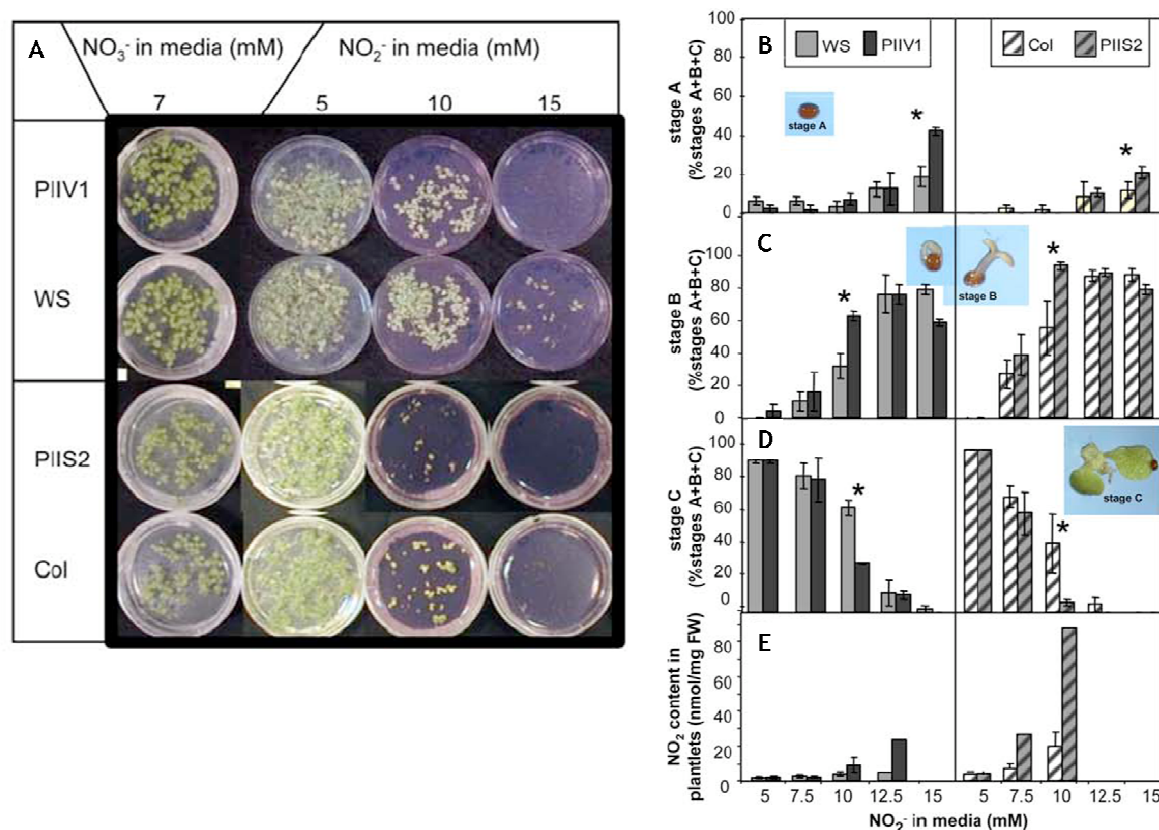


Figura 25: Caratterizzazione fisiologica dei mutanti *AtGLB1* cresciuti su piastre con nitrito come unica risorsa dell'azoto. Le piantine di *A. thaliana wild type* (ecotipi Wassilewskija e Columbia) e dei mutanti PIIV1 e PIIS2 sono state cresciute per 3 settimane su 7 mM NO_3^- , 5 mM, 7.5 mM, 10 mM, 12 mM e 15 mM NO_2^- . (A) Analisi dello sviluppo delle piantine cresciute su piastre contenenti 7 mM NO_3^- oppure 5 mM, 10 mM e 15 mM NO_2^- . (B-D) Analisi del numero di piantine agli stadi A, B e C (illustrati nelle foto nei riquadri). I valori per ogni stadio sono dati dalla percentuale del numero totale di piante allo stadio A, B e C. (E) Contenuto di nitrito nelle piantine nello stadio C. Da Ferrario-Mery *et al.* 2005.

Tuttavia, in questi mutanti, non è stata rilevata nessuna differenza nell'attività della nitrito reduttasi *in vitro* rispetto alle piante *wild type*. Un incremento della sensibilità al nitrito era stata precedentemente osservata in piante di tabacco mutate per una ridotta attività della NiR, quando cresciute *in vitro* su 5 mM NO₂⁻. Questo indica che la sensibilità al nitrito può derivare da un più basso tasso di riduzione del nitrito nei cloroplasti. Poiché l'attività della NiR non era influenzata nei due mutanti ottenuti da Ferrario-Mery e collaboratori nel 2005, l'incremento del contenuto di nitrito potrebbe essere la conseguenza di un ridotto assorbimento del nitrito nei cloroplasti. Questi risultati indicano che PII potrebbe essere coinvolto nell'assorbimento del nitrito dal citosol nei cloroplasti, così come vedremo nel paragrafo 1.4.2.

Tali mutanti, inoltre, presentavano significative differenze nel contenuto di certi metaboliti quando cresciuti in presenza di diverse fonti azotate, paragonati alle piante *wild type* cresciute nelle stesse condizioni (Fig. 26). Il contenuto di ammonio e di aminoacidi totali era leggermente più basso nei mutanti PIIV1 e PIIS2 nel momento dell'aggiunta di ammonio dopo un periodo di crescita in carenza di fonti azotate (Fig. 26A-B). Questo fenomeno era dovuto principalmente ad un più basso accumulo dell'aminoacido Gln, in quanto gli altri aminoacidi principali (Glu, Asp e Asn) variavano in misura minore in queste condizioni (Fig. 26F-G). D'altro canto i livelli degli zuccheri esosi (glucosio e fruttosio), del saccarosio e dell'amido, risultavano lievemente più alti nei mutanti in condizioni di privazione di azoto e di aggiunta successiva di ammonio 1 mM (Fig. 26C-E). In ogni caso, le attività *in vitro* degli enzimi NR e GS non risultavano essere variati tra le piante *wild type* e quelle mutanti [Ferrario-Mery *et al.* 2005]. Ferrario-Mery e collaboratori affermano che questi risultati indicano che le piante mutanti *knockout* per la proteina PII hanno un problema a mantenere un normale rapporto tra C/N in condizioni di carenza di azoto e/o eccesso di ammonio. Normalmente, quando le piante sono sottoposte a condizioni di carenza di azoto, si ha un accumulo degli zuccheri, a causa del limitato uso del saccarosio per la sintesi degli aminoacidi. Inoltre, anche quando le piante sono sottoposte nuovamente all'aggiunta di azoto, ma sottoforma di ammonio (e non di nitrato), normalmente si ha un accumulo di zuccheri a causa dell'inibizione della crescita del germoglio e del ridotto impiego dei metaboliti del carbonio per l'assimilazione dell'ammonio.

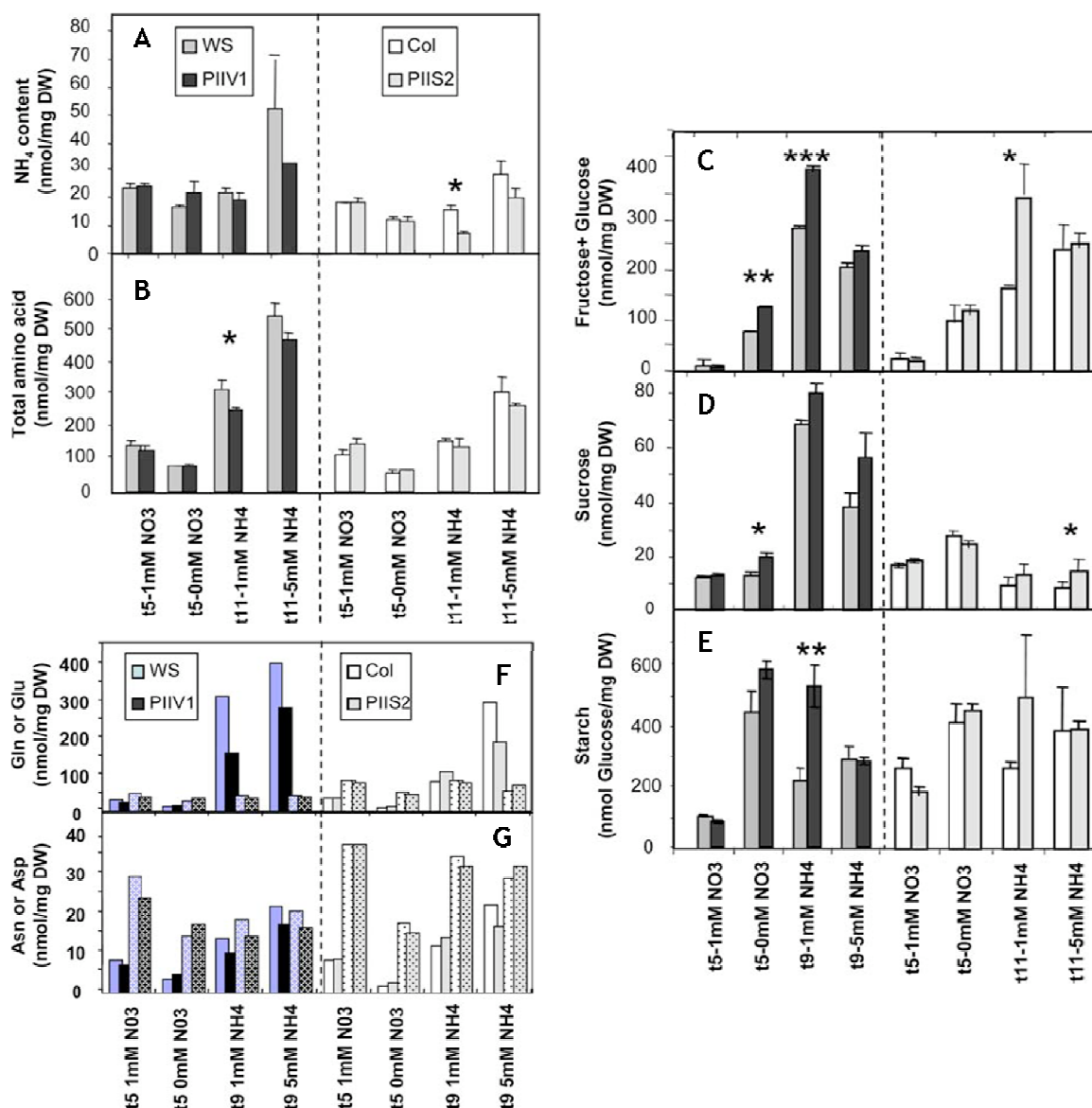


Figura 26: Contenuto dei metaboliti da azoto e da carbonio nei mutanti *AtGLB1* cresciuti in colture idroponiche sotto varie condizioni di fonti azotate. Le piantine di *A. thaliana wild type* ecotipo Wassilewskija (barra grigio scuro in A-E e azzurra in F-G) e Columbia (barra bianca) e dei mutanti PIIV1 (barra nera) e PIIS2 (barra grigio chiaro), sono state cresciute in coltura idroponica con 1 mM NO₃⁻ per 5 settimane (t5-1mM NO₃), prima di essere sottoposte a 5 giorni di privazione d'azoto (t5-0mM NO₃), con successivo trattamento per 4 e 6 giorni con aggiunta di azoto sottoforma di 1 mM o 5 mM NH₄⁺ (t9, t11- 1mM NH₄ e t9, t11-5mM NH₄). (A) Contenuto di ammonio. (B) Contenuto di aminoacidi totali. (C) Contenuto di esosi. (D) Contenuto di saccarosio. (E) Contenuto di amido. (F) Contenuto degli aminoacidi Gln (barra piena) e Glu (barra punteggiata). (G) Contenuto di Asn (barra piena) e Asp (barra punteggiata). Da Ferrario-Mery *et al.* 2005.

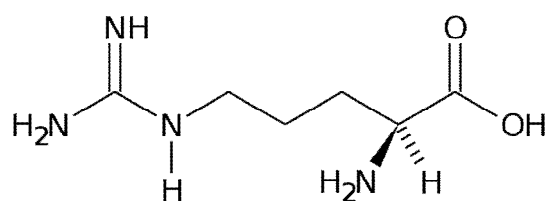
Le piante mutanti invece, in condizioni di carenza d'azoto, producono un accumulo degli zuccheri ma in misura maggiore rispetto alle piante *wild type* e, in condizioni di aggiunta di ammonio come unica fonte di N, esibiscono un più alto incremento del rapporto C/N nella foglia rispetto alle *wild type*. La ragione per cui il fenotipo dei

mutanti PII nelle piante sembra essere meno marcato rispetto a quanto avviene negli organismi procarioti, non è ancora molto chiaro, ma potrebbe essere dovuto all'aumentata complessità di questi organismi nel corso dell'evoluzione.

Infatti, il ruolo della proteina PII nelle piante sembra essere circoscritto al cloroplasto che, a differenza di una singola cellula batterica isolata, è integrato in una cellula eucariotica, che è parte di un organismo multicellulare. Quindi, per comprendere ulteriormente i ruoli della proteina PII nelle piante superiori è stato di fondamentale importanza il successivo approccio biochimico per l'identificazione delle proteine *target* con cui interagisce [Ferrario-Mery *et al.* 2005].

1.4.1 Il complesso PII-NAGK ed il suo ruolo nel metabolismo aminoacidico

Come precedentemente riportato, la proteina PII non sembra legata all'assimilazione dell'azoto o alla sopravvivenza delle piante superiori, suggerendo che questi organismi posseggano addizionali fattori che ricoprono il ruolo occupato da PII in molti procarioti. A dispetto dell'assenza di evidenti fenotipi osservati nelle piante PII-*cre* cresciute in presenza di vari regimi azotati, esperimenti di *yeast two-hybrid* hanno mostrato che la proteina PII nelle piante potrebbe avere un ruolo più specializzato legato al controllo della biosintesi dell'arginina (Arg) interagendo con l'enzima NAGK [Burillo *et al.* 2004; Sugiyama *et al.* 2004], così come avviene nei cianobatteri. L'Arg è un aminoacido di centrale importanza nel metabolismo azotato delle piante superiori; esso infatti risulta fondamentale non solo per la biosintesi delle proteine, ma anche per la produzione di metaboliti secondari, molecole di riserva dell'azoto (come le globuline vegetali) e molecole impiegate nei meccanismi di difesa [Uhrig *et al.* 2009; Zeldler *et al.* 2004]. L'arginina stessa può rappresentare una molecola ideale per la conservazione dell'azoto, data la presenza di 4 atomi di azoto per ogni molecola. Inoltre è stato dimostrato che circa il 40% del contenuto totale di azoto presente in alcuni semi è costituito dall'arginina ed essa è anche l'aminoacido più abbondante nei cotiledoni delle plantule germinate di *Pisum sativum* (pisello), *Glycine max* (soia) e *Pinus toeda* (pino).



Arginina

Anche in *A. thaliana* ed in *O. sativa* è stato visto che le proteine PII (AtGLB1 e OsGLNB rispettivamente) interagiscono con la proteina NAGK alterandone le attività catalitiche [Osanai e Tanaka 2007; Sugiyama *et al.* 2004]. Quindi da multipli *target* nei procarioti, la proteina PII potrebbe aver evoluto nelle piante superiori, la

capacità di interagire con un unico *partner* proteico: NAGK. Come abbiamo detto nel paragrafo precedente, il NAGK è l'enzima che catalizza la tappa limitante del *pathway* di biosintesi dell'Arg (Fig. 27A). Quando quest'enzima è legato a PII mostra un aumento della velocità massima (V_{\max}) ed una riduzione dell'inibizione da parte dell'Arg [Mizuno *et al.* 2007b]. Entrambe le proteine, PII e NAGK, co-localizzano nel cloroplasto. Inoltre è stato visto che la formazione del complesso PII-NAGK è influenzata dall'arginina in un tipico meccanismo di *feedback* da prodotto, come già descritto nei cianobatteri [Chen *et al.* 2006; Beez *et al.* 2009]. È da notare che solo la proteina NAGK esamerica caratteristica dei cianobatteri e degli eucarioti fototrofi è suscettibile all'inibizione da parte dell'Arg; infatti la proteina procariotica dimerica che deriva dal gene paralogo, trovata negli altri organismi che hanno PII, non mostra tale suscettibilità [Forchhammer 2008]. La dissociazione del complesso PII-NAGK è mediata nei cianobatteri da incrementi della concentrazione di 2-ossoglutarato; nelle piante questa dissociazione non è influenzata né da 2-ossoglutarato, né da ATP, né da ADP [Chen *et al.* 2006], anche se il legame del 2-ossoglutarato influenza la capacità di PII di proteggere la NAGK dall'inibizione provocata dall'Arg [Beez *et al.* 2009]. Collettivamente queste scoperte suggeriscono che, quantunque l'interazione tra PII-NAGK sia ben conservata, gli eventi di regolazione si siano evoluti in un modo diverso tra procarioti ed eucarioti fototrofi a partire dalla divergenza della loro linea evolutiva oltre 1,2 bilioni di anni fa [Uhrig *et al.* 2009]. Inoltre le proteine PII cianobatteriche e vegetali possono, almeno in parte, essere funzionalmente interscambiabili *in vitro*. La proteina PII di *A. thaliana* controlla la NAGK cianobatterica con la stessa efficienza della proteina PII procariotica. *Vice versa* la proteina PII di *S. elongatus* può solo parzialmente sostituire la PII vegetale. Per questo la PII di *A. thaliana* contiene tutto l'indispensabile per un'efficiente regolazione della NAGK, mentre la PII cianobatterica, non è in grado di sostituire pienamente la proteina vegetale, probabilmente a causa dell'assenza dei domini C-terminali ed N-terminali caratteristici delle proteine PII di pianta [Beez *et al.* 2009].

Avvaloranti dati biochimici circa la funzione delle proteine PII in pianta sono stati ottenuti utilizzando i mutanti *knockout* di *A. thaliana* PIIV1 e PIIS2. Le linee *knockout* cresciute su mezzi di coltura privi di azoto, a cui è stato successivamente aggiunto ammonio come unica fonte azotata, mostrano un ridotto accumulo di aminoacidi che

va dal 15% al 50% rispetto alle piante *wild type* ed, in particolare, una fortissima riduzione di circa il 40-70% di ornitina, citrullina ed arginina (Fig. 27B) [Ferrario-Mery *et al.* 2006]. Questi mutanti accumulavano una maggiore quantità di saccarosio, amido e zuccheri esosi [Ferrario-Mery *et al.* 2005]. L'eliminazione di PII sembra quindi comportare un'anomala regolazione di NAGK, che a sua volta, riduce la produzione dei prodotti a valle a causa dell'incrementata sensibilità all'inibizione da *feedback* mediata dall'Arg.

Saggi *in vitro* usando proteine PII eterologhe espresse in *A. thaliana* hanno fornito evidenze dirette dell'attivazione della NAGK da parte di PII, mentre analisi di RT-PCR sui geni della biosintesi dell'Arg (anche quello che codifica per la NAGK) hanno dimostrato una trascurabile differenza di espressione di questi geni tra il *wild type* e il mutante *knockout* PIIV1 [Ferrario-Mery *et al.* 2006]. Questo indica che PII agisce modificando il *pathway* di biosintesi dell'arginina a livello *post*-traduzionale. Infatti quando la proteina purificata PII veniva aggiunta alla miscela *in vitro* contenente la NAGK purificata, si aveva un incremento di due volte nell'attività della NAGK (Fig. 28). La massima attivazione della NAGK era osservata con una concentrazione pari almeno a 15 nM della proteina monomerica PII, per 30 nM della NAGK monomerica. Questo risultato è simile a quanto avviene nei cianobatteri, anche se l'attivazione della NAGK da parte di PII in *A. thaliana* è meno marcata rispetto a quella di circa 4 volte osservata nei cianobatteri [Ferrario-Mery *et al.* 2006; Chen *et al.* 2006].

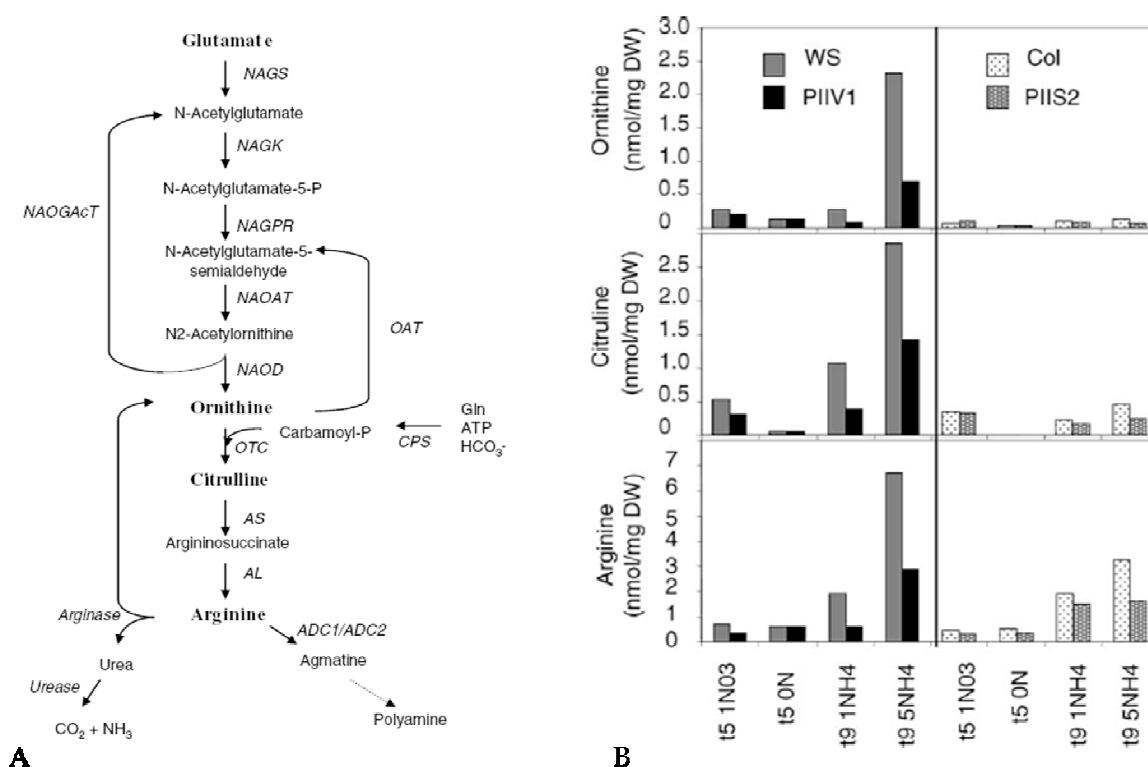


Figura 27: (A) Pathway di biosintesi e catabolismo dell'arginina in *A. thaliana*. NAGS: N-Acetyl glutamate synthase; NAGK: N-Acetyl glutamate kinasi; NAGPR: N-Acetyl glutamate-5-P reductase; NAOAT: N-Acetyl ornithine transaminasi; NAOD: N-Acetyl ornithine deacetylase; NAOGAcT: N-Acetyl ornithine glutamate acetyltransferase; OAT: Ornithine aminotransferase; OTC: Ornithine transcarbamoylase; CPS: Carbamoyl-phosphate synthase; AS: Argininosuccinate synthase; AL: Argininosuccinate lyase; ADC: Arginine decarboxylase. (B) Contenuto di Ornitina, Citrullina ed Arginina nei mutanti PII rispetto al *wild type* cresciuti in differenti condizioni di azoto. Le piantine di *A. thaliana* *wild type* ecotipo Wassilewskija (barra grigia) e Columbia (barra bianca punteggiata) e dei mutanti PIIV1 (barra nera) e PIIS2 (barra grigia punteggiata), sono state cresciute in coltura idroponica con 1 mM NO₃⁻ per 5 settimane (t5-1mM NO₃), prima di essere sottoposte a 5 giorni di privazione d'azoto (t5-0mM NO₃), con successivo trattamento per 4 giorni con aggiunta di azoto sottoforma di 1 mM o 5 mM NH₄⁺ (t9- 1mM NH₄ e t9-5mM NH₄). Da Ferrario-Mery *et al.* 2006.

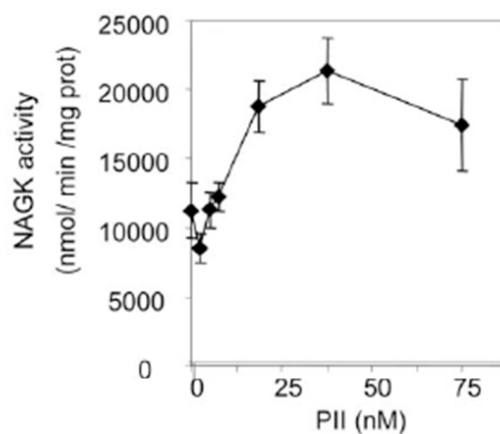


Figura 28: Attivazione dell'enzima NAGK da parte della proteina PII. L'attività della NAGK ricombinante (30 nM) è misurata in presenza di crescenti quantità di PII ricombinante. Da Ferrario-Mery *et al.* 2006.

Mizuno e collaboratori nel 2007 hanno studiato mediante cristallografia a raggi X, la struttura tridimensionale del complesso formato tra due omo-trimeri di PII e un singolo esamero dell'enzima NAGK di *A. thaliana*, legato ai metaboliti N-acetylglutammato, ADP, ATP ed arginina (Fig. 29A-D) [Mizuno *et al.* 2007b]. La dimensione complessiva del complesso dodecamerico (sei monomeri dell'esamero NAGK più due omo-trimeri di PII) è di circa $115 \times 105 \times 105 \text{ \AA}$, con il lato più lungo che si estende dall'estremità N-terminale di un trimero di PII all'estremità N-terminale del trimero di PII opposto (Fig. 29C). Ogni trimero di PII forma delle intime interazioni con una delle due superfici dell'esamero di NAGK. Nella proteina PII, il T-loop ed il Trp²² alla fine dell' α -elica 1, che sono entrambi adiacenti al sito di legame per l'ATP di PII, contattano due foglietti- β ($\beta 6$ e $\beta 7$) e le due α -eliche centrali dell'NAGK (αE e αG), che si trovano sul lato opposto alla tasca del sito attivo (sito di legame per l'ATP e del substrato N-acetylglutammato) (Fig. 29E). La struttura dei due trimeri di PII nel complesso è molto simile alla struttura di PII libero, con l'eccezione del T-loop (residui 49-66) e dell'estremità C-terminale. L'interazione tra PII e l'NAGK sembra limitarsi all'influenza sul grado di apertura e chiusura della tasca del sito attivo dell'NAGK, in opposizione all'effetto inibitorio esercitato dall'arginina, che stabilizza la conformazione aperta dell'NAGK. Questo spiega l'effetto di stimolazione di PII sulla cinetica dell'enzima NAGK inibito da arginina. Infatti è la struttura chiusa che porta i due substrati N-acetylglutammato e ATP vicini tra loro, mentre probabilmente la struttura aperta promuove l'entrata dei substrati ed il rilascio dei prodotti. Il legame di Mg^{2+} -ATP a PII stabilizza una conformazione del T-loop che favorisce le interazioni con l'NAGK. La base azotata dell'ATP si trova in una tasca idrofobica che è occupata dalla Met¹²⁶ in assenza dell'ATP (Fig. 29F-G). Il legame dell'ATP provoca infatti lo spostamento della Met¹²⁶ ed il movimento del C-ter; la Met¹²⁶ è perfettamente conservata nelle piante e si trova nella regione C-terminale esclusiva caratteristica delle proteine PII del mondo vegetale.

Il *pathway* di biosintesi dell'arginina è quindi quello che maggiormente è influenzato dall'assenza di PII, essendo quest'ultimo l'attivatore/regolatore di NAGK che è un enzima chiave nella biosintesi dell'arginina [Uhrig *et al.* 2009]. In questo modo, sebbene i meccanismi di regolazione siano differenti tra cianobatteri e piante superiori, l'interazione tra PII e NAGK è conservata tra questi divergenti organismi

fotosintetici e PII è direttamente coinvolta nel metabolismo degli aminoacidi nelle piante superiori.

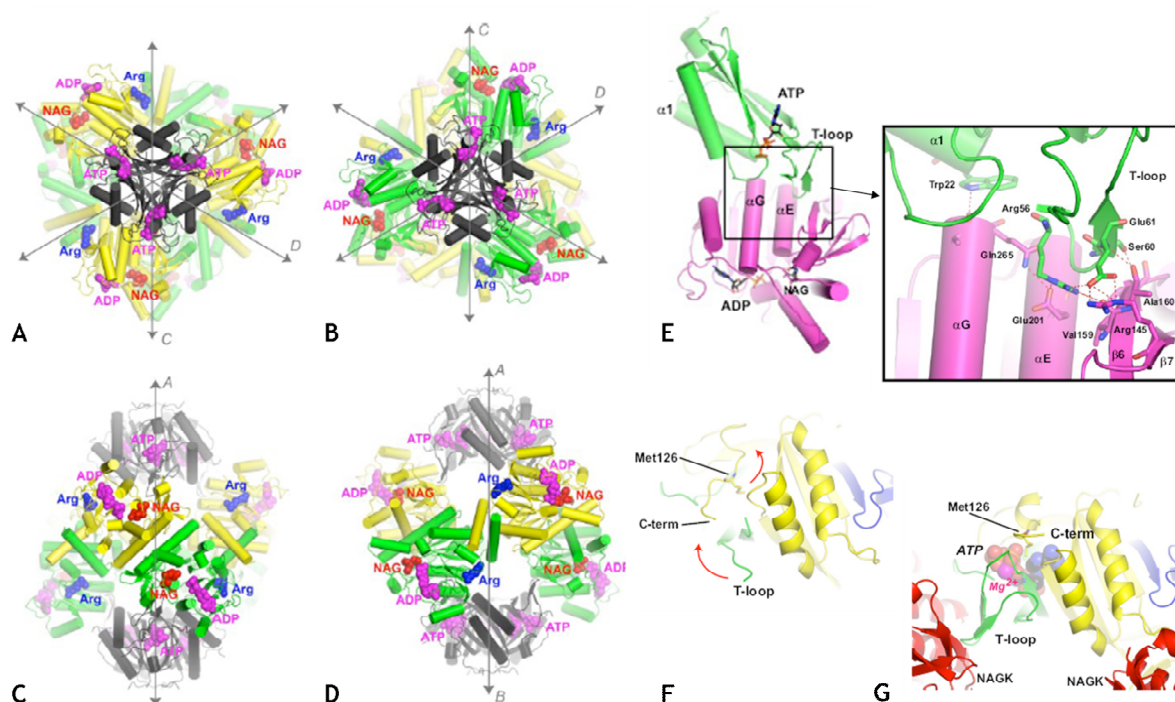


Figura 29: (A-D) Struttura tridimensionale del complesso PII-NAGK di *A. thaliana*. (A-B) Vista dall'alto e dal basso. (C-D) Vista di lato. In tutte le foto sono riportate le prospettive delle altre foto indicate con le lettere A,B,C,D in grigio. I due omo-trimeri di PII sono colorati di nero. L'ATP che lega PII e l'ADP legato all'NAGK sono colorati in lilla. I monomeri di NAGK sono colorati in giallo ed in verde. L'N-acetylglutammato (NAG) è colorato in rosso. Infine l'arginina (Arg) è colorata in blu. (E) Particolare dell'interazione tra PII (in verde) e NAGK (in lilla). La regione rappresentata nel quadrato nella figura di sinistra è ingrandita nella figura di destra ed i legami a ponte idrogeno sono indicati con le linee tratteggiate in rosso. (F-G) Cambi conformazionali indotti dal legame dell'ATP sulla proteina PII. In (F) è riportata la proteina PII libera; in (G) la proteina PII nel complesso con l'NAGK. Sono indicati il T-loop (in verde), l'estremità C-terminale (in giallo) e la Met¹²⁶ nel sito di legame per l'ATP. Le modifiche conformazionali indotte dal legame di Mg²⁺ATP del T-loop e del C-ter sono indicate con una freccia rossa. I tre monomeri di PII sono indicati in verde, in giallo ed in blu. L'NAGK è indicato in rosso. Da Mizuno *et al.* 2007a.

1.4.2 Ruolo di PII nella regolazione dell'assorbimento del nitrito nei cloroplasti

Recentemente in letteratura è stato anche riportato il coinvolgimento della proteina PII nella regolazione dell'assorbimento di nitrito nei cloroplasti della pianta modello *A. thaliana* [Ferrario-Mery *et al.* 2008].

Nelle piante superiori, il nitrito è sintetizzato nel citosol dalla riduzione del nitrato mediante l'enzima nitrato reduttasi (NR). Il nitrito è poi traslocato nei cloroplasti per essere ulteriormente ridotto ad ammonio dalla nitrito reduttasi (Fig. 30A). La concentrazione di nitrito intracellulare è finemente regolata in modo da prevenire eventuali effetti tossici dovuti all'accumulo del nitrito all'interno della cellula vegetale. Questo potrebbe essere parzialmente dovuto alla regolazione dell'attività della NR attraverso il bilanciamento del potenziale redox ed il trasportatore ossalacetato/malato che potrebbe trasferire agenti riducenti per l'attività della NR. Quest'enzima è generalmente attivo alla luce; al buio la NR viene inattivata in seguito ad un evento di fosforilazione su un residuo di serina (Ser⁵³⁴ in *A. thaliana* e Ser⁵²¹ in tabacco) con successivo legame della proteina 14-3-3, in modo da evitare l'accumulo di nitrito quando il potere riducente (NADH) è limitante [Lillo *et al.* 2004]. L'inibizione della NR è osservata solo in presenza di cationi, di cui i più importanti sono il Mg²⁺ e le poliammine. La luce invece promuove la de-fosforilazione e quindi l'attivazione della NR (Fig. 30E). Il bilanciamento tra l'attività della chinasi e della fosfatasi che agiscono su NR e NR-P, determina il grado di fosforilazione dell'enzima. NR e NR-P sono degradati con una velocità costante tanto alla luce quanto al buio; la maggiore quantità di NR alla luce, è collegata all'effetto positivo esercitato dalla luce, sulla sintesi di NR (trascrizione e traduzione). La NR catalizza anche un'altra reazione che converte il NO₂⁻ in ossido nitrico (NO), una molecola con effetti dannosi per le piante, ma che agisce anche come molecola segnale, influenzando la crescita e lo sviluppo e promuovendo la chiusura stomatica [Lillo *et al.* 2004].

È noto che il nitrito può essere trasportato nei cloroplasti sia nella forma protonata (acido nitroso, HNO₂), sia sottoforma ionica (NO₂⁻), ma il meccanismo molecolare dell'assorbimento del nitrito nei cloroplasti non è ancora chiaro. La forma protonata è

in grado di diffondere attraverso la membrana, mentre lo ione nitrito necessita certamente di un sistema di trasporto attivo. Un gene possibilmente coinvolto in questo trasporto ad alta affinità, *Nar1-1*, è stato isolato nel 2000 nell'alga unicellulare *C. reinhardtii*, ma nessun ortologo di questo gene è stato finora identificato nel genoma di *A. thaliana*. Recentemente un trasportatore del NO_2^- , CsNitr1-L, è stato identificato nella pianta superiore *Cucumis sativus* (cetriolo) [Sugiura *et al.* 2007]. Si tratta di un membro della famiglia di trasportatori di oligopeptidi protoni-dipendenti (POT), ma questo mostra solo una lieve percentuale di identità con il trasportatore del nitrito descritto nei cianobatteri ed in *C. reinhardtii*. Inoltre analisi trascrittomiche del mutante PIIV1 comparato al controllo *wild type*, indicano che l'espressione di questo trasportatore non è alterato nelle piante mutanti cresciute in diversi regimi azotati [Ferrario-Mery *et al.* 2008]. Usando cloroplasti integri isolati da foglie di *A. thaliana* e nitrito marcato con ^{15}N , le piante mutanti *knockout* per il gene di PII, PIIV1 e PIIS2, hanno mostrato un incremento del 30-40% dell'assorbimento luce-dipendente del nitrito nei cloroplasti, se paragonate alle piante *wild type* [Ferrario-Mery *et al.* 2008]. Gli autori hanno dimostrato che l'assorbimento del nitrito aumentava linearmente durante il periodo di tempo analizzato (tra 5 e 30 minuti) e richiedeva luce, sebbene al buio si aveva un piccolo assorbimento di nitrito in modo stabile per entrambi i genotipi (Fig. 30B).

Un fenomeno simile era stato precedentemente osservato nei cianobatteri in cui PII ha il ruolo di regolare un trasportatore di tipo ABC di nitrito e nitrato, NtrC, anche se non è stato trovato in pianta nessun omologo di questo trasportatore. Il maggiore assorbimento del nitrito nei cloroplasti delle piante mutanti determinava una maggiore percentuale di incorporazione dell' ^{15}N nell'ammonio e negli aminoacidi nei cloroplasti incubati alla luce dopo 30 minuti su $^{15}\text{NO}_2\text{Na}$ (Fig. 30C). A conferma del fatto che le differenze di incorporazione fossero dovute ad una diversa capacità di *uptake* del NO_2^- si è verificato che esse non dipendevano dalle attività degli enzimi GS e GOGAT. Infatti, per comprendere meglio l'effetto di PII sull'assorbimento del nitrito, è stato analizzato l'effetto di alcuni specifici inibitori su queste due attività enzimatiche. Infatti è stato visto che inibitori dell'assimilazione dell'azoto, come MSO (*Methionine sulfoximine*) e Azaserina, che inibiscono la GS e la GOGAT rispettivamente, non riducono in modo significativo le differenze di assorbimento

del nitrito tra le piante *wild type* e le piante mutanti (Fig. 30D). Inoltre, l'aggiunta del DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea), un inibitore del fotosistema II della catena di trasporto degli elettroni della fotosintesi, riduceva in modo significativo l'assorbimento luce-dipendente del nitrito in modo analogo nelle piante *wild type* e mutanti, portando tale valore a valori simili a quelli ottenuti al buio (Fig. 30D). È stato inoltre analizzato l'effetto dell' NH_4^+ e dell' α -chetoglutarato sull'assorbimento del nitrito, poiché l'ammonio è stato descritto come inibitore dell'assorbimento di nitrato e nitrito nei cianobatteri. Questo effetto di inibizione è mediato dalla proteina PII che interagisce ed inibisce il trasportatore di nitrato e nitrito in condizioni di bassa concentrazione di α -chetoglutarato. Tuttavia, nella pianta modello *A. thaliana* non è stato osservato alcun effetto dell'ammonio e dell' α -chetoglutarato sull'assorbimento di nitrito luce-dipendente, in entrambi i genotipi analizzati (*wild type* e mutanti) [Ferrario-Mery *et al.* 2008].

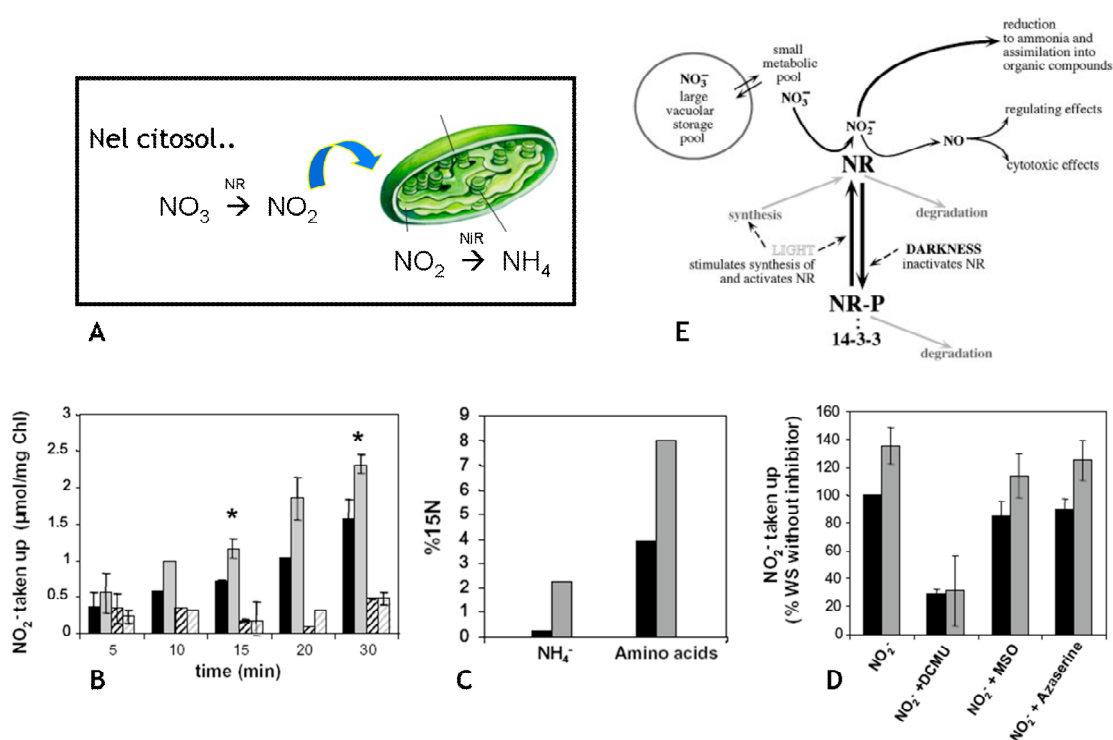


Figura 30: (A) Rappresentazione grafica del sito di produzione del nitrito ad opera della NiR. (B) Cinetica di assorbimento del $^{15}\text{NO}_2\text{Na}$ (0,2 mM) alla luce (barre piene) ed al buio (barre a strisce) nei cloroplasti isolati di piante di *A. thaliana* *wild type* ecotipo Wassilewskija (barra nera) e del mutante PIIV1 (barra grigia), in funzione del tempo di incubazione (5-30 minuti). (C) Percentuale di marcatura con ^{15}N dell'ammonio e dell'insieme di aminoacidi liberi nei cloroplasti isolati dopo 30 minuti di incubazione su $^{15}\text{NO}_2\text{Na}$ (0,2 mM) delle piante di *A. thaliana* *wild type* ecotipo Wassilewskija (barra nera) e del mutante PIIV1 (barra grigia). (D) Effetto degli inibitori (50 μM DCMU o 1 mM azaserina o 1 mM MSO) sull'assorbimento del $^{15}\text{NO}_2\text{Na}$ (0,2 mM) luce-dipendente nei cloroplasti isolati di piante di *A. thaliana* *wild type* ecotipo Wassilewskija (barra nera) e del mutante PIIV1 (barra grigia) dopo 30 minuti di incubazione. Da Ferrario-Mery *et al.* 2008. (E) Rappresentazione schematica della regolazione dell'attività della NR. Da Lillo *et al.* 2004.

Il più alto tasso di assorbimento del nitrito nei cloroplasti delle piante mutanti PII, potrebbe spiegare anche il maggior grado di sensibilità al nitrito riscontrato per queste piante, rispetto alle piante *wild type* (Fig. 25). Un tale aumento della concentrazione cloroplastidica del nitrito non viene riscontrata normalmente, anche se l'accumulo di nitrito era stato precedentemente osservato in alcune condizioni di stress dovute all'assenza di ossigeno (radici anossiche) in cui la NR era pienamente attiva, ma la NiR funzionava in maniera ridotta [Lillo *et al.* 2004]. Poiché l'assorbimento del nitrito è maggiore in assenza di PII e, considerando che l'attività della NiR *in vitro* non è influenzata nel mutante per PII, la maggiore tossicità al nitrito delle piante mutanti può essere spiegata dall'accumulo del nitrito nei cloroplasti. L'assorbimento del nitrito nei cloroplasti è un processo luce-dipendente (che fornisce carbonio ed energia), e richiede il funzionamento corretto del sistema di trasporto degli elettroni del fotosistema II. PII sembra quindi essere coinvolta nella *down-regolazione* dell'assorbimento luce-dipendente del nitrito nei cloroplasti e questo effetto di regolazione è in funzione dello *status* metabolico e dallo *status* energetico della cellula.

1.4.3 Ruolo di PII nella biosintesi degli acidi grassi

Un'ulteriore recente caratterizzazione funzionale della proteina PII ha dimostrato il suo coinvolgimento anche nella sintesi degli acidi grassi [Feria Bourrellier *et al.* 2010]. Un enzima chiave per la biosintesi degli acidi grassi è l'acetil-CoA carbossilasi (ACCase) che catalizza la formazione irreversibile di malonil-CoA da acetil-CoA e bicarbonato. In natura quest'enzima esiste in due differenti forme. Una prima forma eteromericale composta da quattro subunità che si ritrova nei procarioti e una forma omomericale composta da una singola catena polipeptidica che si ritrova negli eucarioti. Nei batteri è presente solo la forma eteromericale con 4 subunità: la proteina che trasporta la biotina (BCCP, *biotin carboxyl carrier protein*), la biotina carbossilasi (BC) e le subunità α e β della transcarbossilasi (CT, *carboxyltransferase*), che formano 3 domini funzionali (Fig. 31A). Negli animali è presente solo la forma omomericale in cui, le diverse subunità fanno parte di uno stesso polipeptide multifunzionale, mentre in molte piante superiori sono presenti entrambe le forme: la forma eteromericale nei plastidi e la forma omomericale nel citosol (Fig. 31B) [Sasaki e Nagano 2004]. Fanno eccezione alcune piante, come orzo e riso, in cui la forma omomericale è presente sia nei cloroplasti che nel citosol. In tutti i casi l'acetil-CoA carbossilasi contiene come gruppo prostetico la biotina, legata covalentemente (mediante legame amidico) al gruppo ϵ -amminico di un residuo di lisina di una delle tre subunità proteiche. La reazione, che avviene in due tappe, prevede che il gruppo carbossilico (che deriva dal bicarbonato, HCO_3^-) venga prima trasferito alla biotina, in una reazione che richiede ATP. La biotina agisce come trasportatore temporaneo dell'anidride carbonica prima di essere trasferita all'acetil-CoA nella seconda tappa che produce malonil-CoA. Il malonil-CoA così formato verrà poi utilizzato per la sintesi di acidi grassi mediante una sequenza di reazioni ripetute catalizzate dal complesso multienzimatico dell'acido grasso sintasi [Nelson e Cox 2002]. A differenza di quanto avviene nelle cellule di lievito e degli animali, nelle cellule fotosintetiche delle piante, la sintesi degli acidi grassi non avviene nel citosol, ma nello stroma dei cloroplasti (Fig. 31C). Infatti l'elevato rapporto NADPH/NADP⁺ (a causa della produzione di NADPH durante le reazioni alla luce della fotosintesi), presente in questo compartimento, crea le condizioni ottimali per favorire questa via

anabolica. Quando una cellula dispone di una quantità di combustibile metabolico sufficiente alle sue esigenze energetiche, l'eccesso eventualmente presente viene convertito in acidi grassi e conservato sotto forma di lipidi, cioè di triacil-gliceroli.

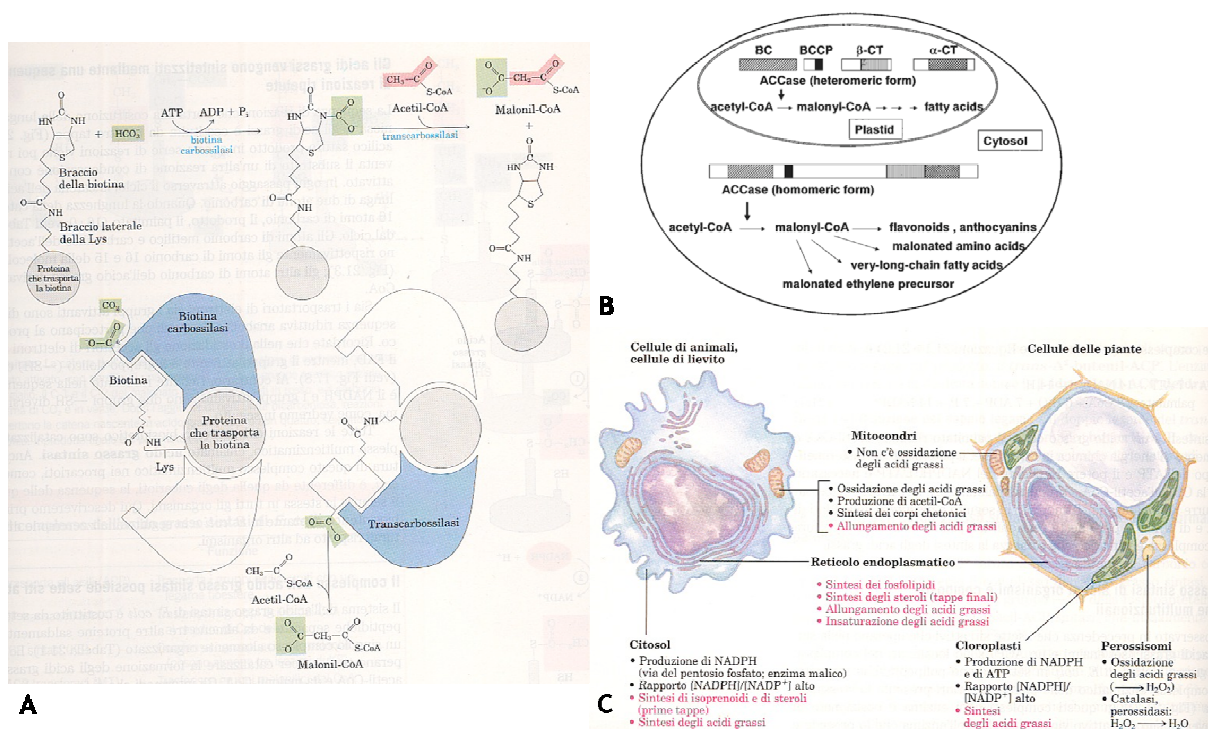


Figura 31: (A) Reazione dell'acetyl-CoA carbossilasi e rappresentazione schematica dei 3 domini funzionali: trasporto della biotina (in grigio), biotina carbossilasi (in blu), e transcarbossilasi. La regione dell'enzima attivo in ciascuna tappa della reazione enzimatica è indicata con il colore blu. Da Nelson e Cox 2002. (B) Compartimentazione delle due forme di ACCasi presenti nelle cellule vegetali. Da Sasaki e Nagano 2004. (C) Localizzazione subcellulare del metabolismo lipidico. La sintesi degli acidi grassi avviene nel compartimento in cui è disponibile la quantità maggiore di NADPH nelle reazioni riduttive. Da Nelson e Cox 2002.

La sintesi degli acidi grassi che avviene nei cloroplasti delle cellule vegetali genera acidi grassi C_{16:0} e C_{18:1} ed una piccola quantità di acidi grassi C_{18:0}. Una volta trasportati attraverso la membrana plastidiale, queste catene di acidi grassi vengono ulteriormente modificate (formando acidi grassi insaturi e/o a lunga catena, VLCFA, *very long chain fatty acid*) nel reticolo endoplasmatico (ER). A differenza di quanto avviene per le cellule animali, in cui la sintesi e la modificazione degli acidi grassi avviene nello stesso compartimento subcellulare (ER), nelle cellule vegetali questi due eventi sono spazialmente separati. La reazione catalizzata dall'acetyl-CoA carbossilasi è la tappa che limita la velocità della biosintesi degli acidi grassi e questo enzima è un rilevante sito di regolazione metabolica; quest'enzima infatti, è

altamente regolato sia nei livelli, che nell'attività. La forma eteromerică dell'ACCasi delle piante è, come abbiamo detto, composta da 4 subunità, una delle quali è codificata dal genoma del cloroplasto (gene *accD*) e le rimanenti 3 sono codificate dal genoma nucleare (geni *accA*, *accB* e *accC*). La regolazione della produzione dell'enzima ACCasi avviene in diversi momenti: a livello trascrizionale, a livello dell'*editing* dell'RNA ed a livello *post*-trascrizionale (durante l'assemblaggio delle 4 subunità), anche se non si conoscono i precisi meccanismi ed i fattori coinvolti [Sasaki e Nagano 2004]. La regolazione dell'attività dell'ACCasi avviene, nei vertebrati, ad opera del citrato o da eventi di fosforilazione e defosforilazione. Il meccanismo di regolazione dell'attività dell'enzima vegetale è ancora poco chiaro, ma si sa che avviene per un aumento del pH, del potenziale redox e della concentrazione di Mg^{2+} nello stroma; queste condizioni si raggiungono quando le piante vengono sottoposte alla luce [Nelson e Cox 2002]. La luce infatti è il maggior fattore che influenza l'attività di questo importante enzima metabolico. Durante la fotosintesi, ATP e NADPH sono prodotti nei cloroplasti e vengono in parte utilizzati per la sintesi degli acidi grassi; il tasso di questa reazione cambia rapidamente alla luce ed al buio in seguito all'attivazione o all'inattivazione dell'ACCasi [Sasaki e Nagano 2004].

Un ultimo lavoro fatto da Ferial Bourrelier e collaboratori l'anno scorso è stato mirato ad identificare nuove proteine *target* con cui la proteina PII interagisce. Sono state quindi eseguite cromatografie di affinità per PII degli estratti solubili di cloroplasti di foglie di *A. thaliana* ed è stato visto che diverse proteine erano trattenute (solo) in presenza di Mg^{2+} ATP e queste venivano specificamente rilasciate dalla resina attraverso l'applicazione di un *buffer* di eluizione contenente 2-ossoglutarato. Analisi di spettroscopia di massa eseguite su una banda proteica identificata con SDS-PAGE hanno rivelato la subunità proteica di trasporto della biotina dell'acetil-CoA carbossilasi plastidiale e tre altre proteine contenenti un simile motivo di legame, oltre alla già nota NAGK. In saggi *in vitro* effettuati con l'aggiunta di ATP esogeno, è stato visto che la proteina PII ricombinante di *A. thaliana* inibiva l'attività dell'ACCasi dei cloroplasti di circa il 50% e l'effetto inibitorio era dipendente dalla concentrazione di PII (Fig. 32). Basse concentrazioni potrebbero legare quantità irrilevanti di ATP e, per questo, non influenzare la reazione dell'ACCasi. A differenza di quanto avviene

con l'aggiunta di PII, l'aggiunta di NAGK o di CPO (*coproporphyrinogen III oxidase*) come proteina plastidiale o di BSA come proteina non specifica delle piante, non produce alcun effetto sull'attività dell'ACCasi (Fig. 32A).

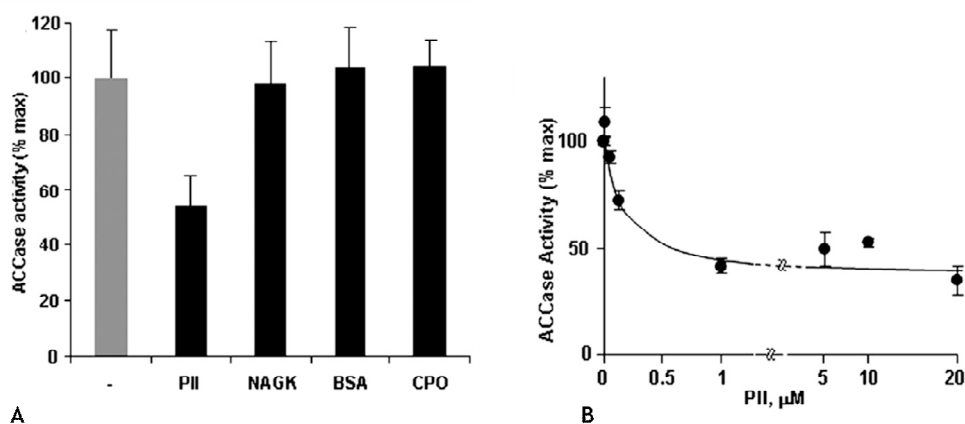


Figura 32: Inibizione dell'attività ACCasica nei cloroplasti da parte della proteina PII. (A) L'attività dell'ACCasi è saggiata in assenza e in presenza di PII ($0.36 \mu\text{M}$). La specificità dell'inibizione da PII è stata testata con l'aggiunta di altre proteine: NAGK, BSA (proteina animale) e la CPO (proteina plastidiale). (B) Curva dell'attività dell'ACCase plastidiale in relazione alla concentrazione della proteina PII. L'inibizione è dose-dipendente. Da Feria Bourrellier *et al.* 2010.

PII induce un decremento di circa il 50% della V_{max} della reazione dell'ACCasi senza alterare la K_m per l'acetyl-CoA (Fig. 33D) [Feria Bourrellier *et al.* 2010]. Ricordiamo che la K_m è il valore di concentrazione di substrato che corrisponde a quella presente alla metà della velocità massima della reazione e che esprime l'affinità di un enzima per un determinato substrato. Esistono diversi meccanismi di inibizione enzimatica: inibizione competitiva, non competitiva e acompetitiva. Nell'inibizione di tipo competitivo l'inibitore compete con il substrato legandosi al sito attivo o modificando il sito attivo legandosi al sito allosterico ed impedendo al substrato di legarsi. L'enzima non è capace di legarsi al substrato quando l'effettore si è legato ed è vero anche l'inverso (Fig. 33A). Questo meccanismo di inibizione è molto frequente quando l'inibitore è strutturalmente analogo al substrato ed è caratteristico perché la V_{max} non cambia, ma cambia la K_m (aumentando) perché in presenza di inibitore l'affinità dell'enzima per il substrato diminuisce. Inoltre, la K_m aumenta di un valore che è funzione sia della quantità di inibitore che della K_i , che indica l'affinità di un inibitore per l'enzima (minore è la K_i più alta è l'affinità e quindi maggiore sarà l'efficacia dell'inibizione). Nell'inibizione non competitiva l'inibitore non compete

con il substrato per il possesso dell'enzima, ma si lega all'enzima indipendentemente dalla presenza e dalla quantità di substrato. Non c'è competizione perché il sito attivo e il sito allosterico sono indipendenti l'uno dall'altro. Se l'inibitore si lega al sito allosterico non impedisce al substrato di legarsi al sito attivo perché quest'ultimo si modifica molto poco e ci si trova di fronte ad un complesso ternario. Il complesso ternario è bloccato e pur tenendo legato il substrato non è in grado di trasformarlo in prodotto perché non è in grado di subire quelle modificazioni conformazionali necessarie per la trasformazione. Sono possibili due strade: si può legare prima il substrato o prima l'inibitore ma in ogni caso, in presenza di inibitore, si forma il complesso ternario bloccato (Fig. 33B). In questo caso la cinetica cambia perché la V_{\max} diminuisce in presenza di inibitore non competitivo, mentre la K_m resta invariata essendo i due siti indipendenti. La V_{\max} diminuisce tanto più c'è inibitore e tanto più è bassa la K_i . Infine nell'inibizione di tipo acompetitivo, l'inibitore non inibisce l'enzima né con un meccanismo competitivo né con un meccanismo non competitivo. In questo caso l'inibitore non riesce a legarsi all'enzima libero e si può legare solo al complesso ES. Quando il substrato si lega all'enzima nel sito attivo, la molecola enzimatica si modifica conformazionalmente e si forma un nuovo sito che è il sito allosterico su cui si può legare l'inibitore. Quando quest'ultimo si lega, si forma il complesso IES ed essendo bloccata la funzionalità dell'enzima non si può avere la formazione di prodotto. Quindi non c'è competizione ma non è nemmeno un meccanismo non competitivo (Fig. 33C). In questo caso, in presenza dell'inibitore, l'equilibrio viene spinto verso una maggiore formazione di complesso ES perché, poiché il complesso ES viene sequestrato (formando IES), per il principio di Le Chatelier, il sistema spinge verso il complesso ES, quindi la K_m diminuisce (perché aumenta l'affinità del substrato per l'enzima). V_{\max} e K_m diminuiscono della stessa entità in funzione della concentrazione di inibitore e della K_i . La proteina PII quindi si comporta come un tipico inibitore non competitivo dell'enzima ACCasi del cloroplasto, poiché si ha, come detto precedentemente, un decremento di circa il 50% della V_{\max} della reazione dell'ACCasi, senza alterare la K_m per l'acetil-CoA (Fig. 33D).

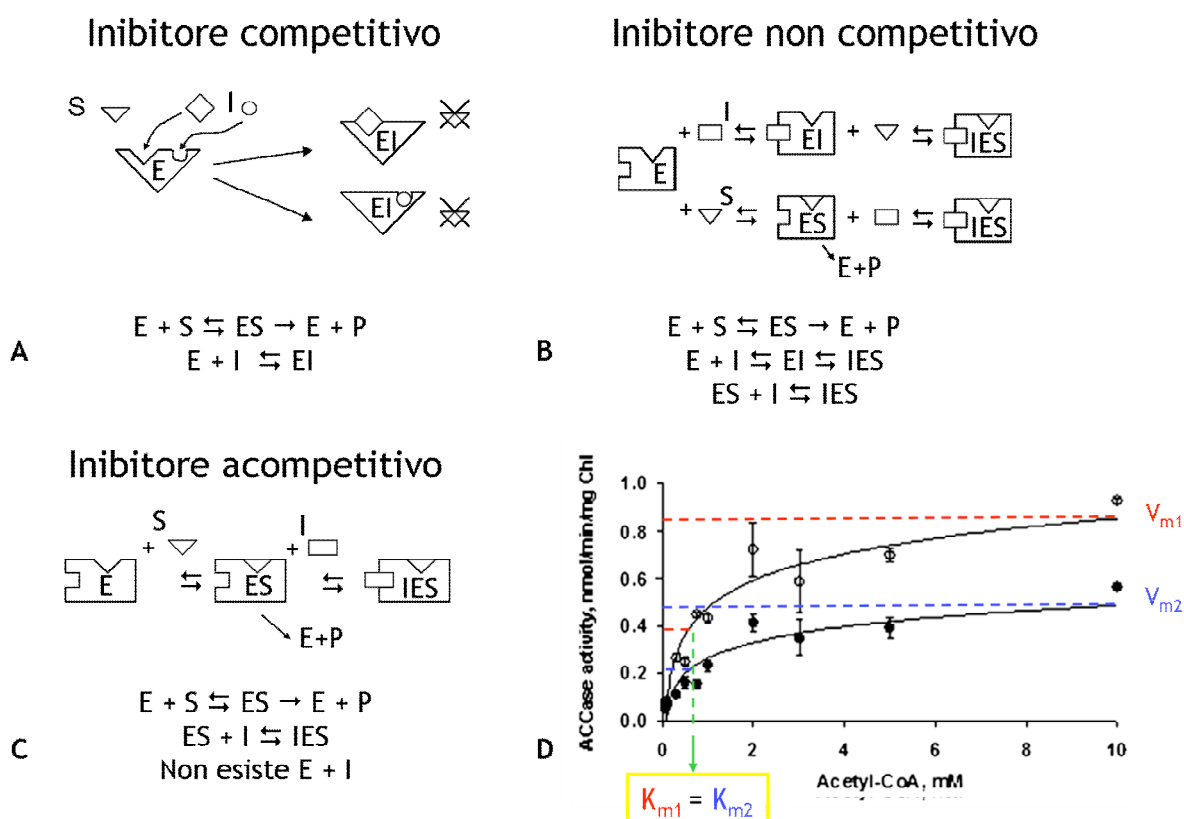


Figura 33: (A-C) Rappresentazione schematica dell'inibizione di tipo competitivo, non competitivo e incompetitivo. E: enzima; S: substrato; I: inibitore; P: prodotto. (D) Effetti di PII sui parametri cinetici della reazione dell'ACCase, determinati dalla curva di saturazione da acetil-CoA. L'attività dell'ACCase è stata saggiata in assenza (cerchietti bianchi) ed in presenza (cerchietti neri) di PII. I parametri genetici sono stati calcolati usando il grafico dei doppi reciproci di Lineweaver-Burk. Modificata da Feria Bourrellier *et al.* 2010.

Inoltre questo meccanismo di inibizione era completamente invertito in presenza di 2-ossoglutarato (2-OG), piruvato o ossalacetato (OAA) e l'attività dell'ACCase ritornava ai livelli equivalenti a quelli misurati in assenza di PII (Fig. 34). D'altro canto, l'aggiunta di malato, citrato, fosfoenolpiruvato (PEP) o biotina non riduceva l'inibizione dell'attività dell'ACCase mediata da PII (Fig. 34A) [Feria Bourrellier *et al.* 2010]. Il recupero dell'attività dell'ACCase è dipendente dalla concentrazione di 2-ossoglutarato (Fig. 34B), che è lo scheletro di carbonio richiesto per il *pathway* della GS/GOGAT, fondamentale per l'assimilazione dell'ammonio e per la sintesi degli aminoacidi. Ad una concentrazione di 1 mM, il 2-ossoglutarato annulla quasi del tutto l'effetto di inibizione dell'attività dell'ACCase da parte di PII e si ha un effetto di riduzione del 50% già con circa 0,08 mM di 2-ossoglutarato.

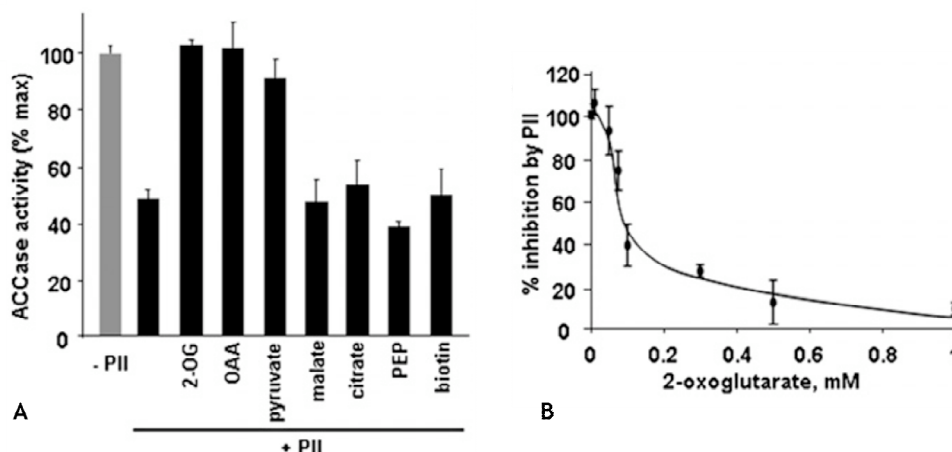


Figura 34: Effetto di diversi metaboliti sull'attività di inibizione indotta da PII sull'ACCasi nei cloroplasti. (A) L'attività dell'ACCasi è stata saggiata in assenza ed in presenza di PII (0.36 μ M) o in presenza di specifici metaboliti (5 mM). Nel controllo privo di PII, i metaboliti non alterano l'attività dell'enzima. (B) Recupero dell'attività dell'ACCasi in funzione di concentrazioni crescenti di 2-ossoglutarato. Da Feria Bourrellier *et al.* 2010.

Questo è in accordo con quanto osservato fino ad ora, secondo cui il 2-ossoglutarato è il principale metabolita antagonista delle interazioni PII-proteina ed è interessante notare che i due acidi organici coinvolti nella sintesi dell'acetil-CoA (ossalacetato e piruvato) riducono anch'essi l'effetto di inibizione dell'ACCasi da parte della proteina PII. Tale proteina ha quindi modificato il suo meccanismo d'azione nel corso dell'evoluzione dai sistemi batterici ai sistemi vegetali divenendo importante non solo nel metabolismo dell'N (regolando la sintesi dell'arginina e dei composti azotati a valle), ma anche per controllare il *pathway* metabolico di sintesi degli acidi grassi nei cloroplasti, in funzione dello stato energetico e della disponibilità degli scheletri carboniosi presenti nella cellula vegetale. Questo meccanismo di controllo deve essere incorporato nel complesso *network* di regolazione dell'ACCasi. Quest'enzima infatti è fosforilato ed è soggetto ad un controllo redox tioredossina-dipendente che lo *up*-regola quando le foglie sono esposte alla luce. Durante il giorno, la sua attività può comunque essere *down*-regolata dalla proteina PII in presenza di alte concentrazioni di ATP, a meno che non ci siano sufficienti scheletri di carbonio disponibili. La proteina PII quindi rientra in questo complesso scenario metabolico modificando i *pathway* responsabili del rapporto tra C (acidi grassi)/N (aminoacidi) in relazione al contesto fisiologico. Questa regolazione potrebbe essere ancora più importante in alcuni organi, come i semi, in cui la sintesi di aminoacidi ed acidi

grassi deve essere attentamente coordinata durante il periodo di maturazione del seme. La comprensione del preciso meccanismo di regolazione dell'ACCasi nei semi ed i fattori coinvolti, sono di grande interesse, anche in funzione di eventuali strategie biotecnologiche che potrebbero essere messe in campo per manipolare l'attività di questo enzima con l'obiettivo di aumentare il contenuto oleico dei semi [Feria Bourrellier *et al.* 2010].

1.4.4 Ruolo tessuto-specifico di PII nei semi

Basandosi sui dati di espressione trascrizionale di PII da due programmi *in silico* utilizzati per *A. thaliana* (*BioArray Resource* e *Genevestigator*), è stato identificato un *pattern* di espressione tessuto-specifico per la proteina PII [Uhrig *et al.* 2009]. Sebbene sia stata osservata solo una piccola variazione nel livello di trascritto nelle foglie in via di sviluppo, un incremento di circa 10 volte è stato invece osservato per i semi dalle prime fasi alle fasi intermedie dello sviluppo (Fig. 35). Considerando le precedenti osservazioni biochimiche che indicano che PII attiva l'NAGK (riducendo l'inibizione da *feedback* da prodotto da parte dell'arginina) e l'elevata quantità di proteine di riserva contenenti arginina in molti semi, questo incremento del trascritto di PII durante la maturazione del seme suggerisce un ruolo tessuto-specifico di PII nella regolazione della biosintesi dell'arginina come parte del processo di maturazione del seme. L'analisi quantitativa del trascritto nel corso dello sviluppo del seme mostrato nella Figura 35, potrebbe indicare due differenti meccanismi: in uno di questi il trascritto di PII potrebbe essere accumulato in modo preventivo per una successiva produzione della proteina PII durante gli ultimi stadi dello sviluppo del seme; nel secondo, ci potrebbe essere un accumulo del trascritto di PII in parallelo alla produzione della proteina durante i primi/intermedi stadi di maturazione del seme. In entrambi i casi, questo porterebbe ad una riduzione nell'inibizione della NAGK da parte dell'Arg e quindi ad un'aumentata biosintesi delle molecole contenenti arginina (come le proteine di riserva). Dati aggiuntivi provenienti da esperimenti di *microarray*, indicano che il trascritto di PII viene *up-regolato* più di 8 volte nelle piante di *A. thaliana* che *over-esprimono* il fattore di trascrizione LEC1 (*Leafy Cotyledon 1*). Queste piante transgeniche mostrano una maggiore espressione anche di numerosi geni coinvolti nella biosintesi di prodotti di riserva [Uhrig *et al.* 2009]. La maggior parte di questi geni sono responsabili della biosintesi di lipidi derivati da acidi grassi (11,3%), i restanti sono coinvolti nel metabolismo degli aminoacidi (4,7%) e nella produzione di proteine di riserva (3,3,%). Un ulteriore suggerimento del coinvolgimento di PII nella maturazione dei semi e nella biosintesi dei prodotti di riserva provengono da dati di esperimenti di *microarray* che

dimostrano l'espressione preferenziale del gene di PII nel sospensore (struttura filamentosa sviluppata dallo zigote nella maturazione del seme per connettere l'embrione all'endosperma), nella siliqua (frutto secco, deiscete di tipo capsula bicarpellare, caratteristico della famiglia delle *Brassicaceae* o *Cruciferae* cui *A. thaliana* appartiene) e nell'endosperma dei semi di *A. thaliana* in via di sviluppo.

A differenza delle notevoli variazioni del trascritto di PII durante lo sviluppo dei semi, i livelli del trascritto di NAGK non subiscono grosse variazioni (Fig. 35). Questo potrebbe indicare che la produzione dei composti e/o delle proteine che contengono Arg resti suppergiù allo stesso livello durante la maturazione dei semi. La proteina PII nelle foglie quindi, percependo allostericamente i livelli cellulari di carbonio ed energia, interagisce con l'NAGK e l'ACCasi (forma eteromeric), modulando l'attività biologica di questi due enzimi plastidiali che consumano ATP e carbonio. La produzione di semi rappresenta un fondamentale meccanismo biologico che permette la sopravvivenza delle piante in sfavorevoli condizioni. I semi contengono l'insieme di tutto il materiale genetico e di nutrienti indispensabili per lo stabilirsi della generazione successiva.

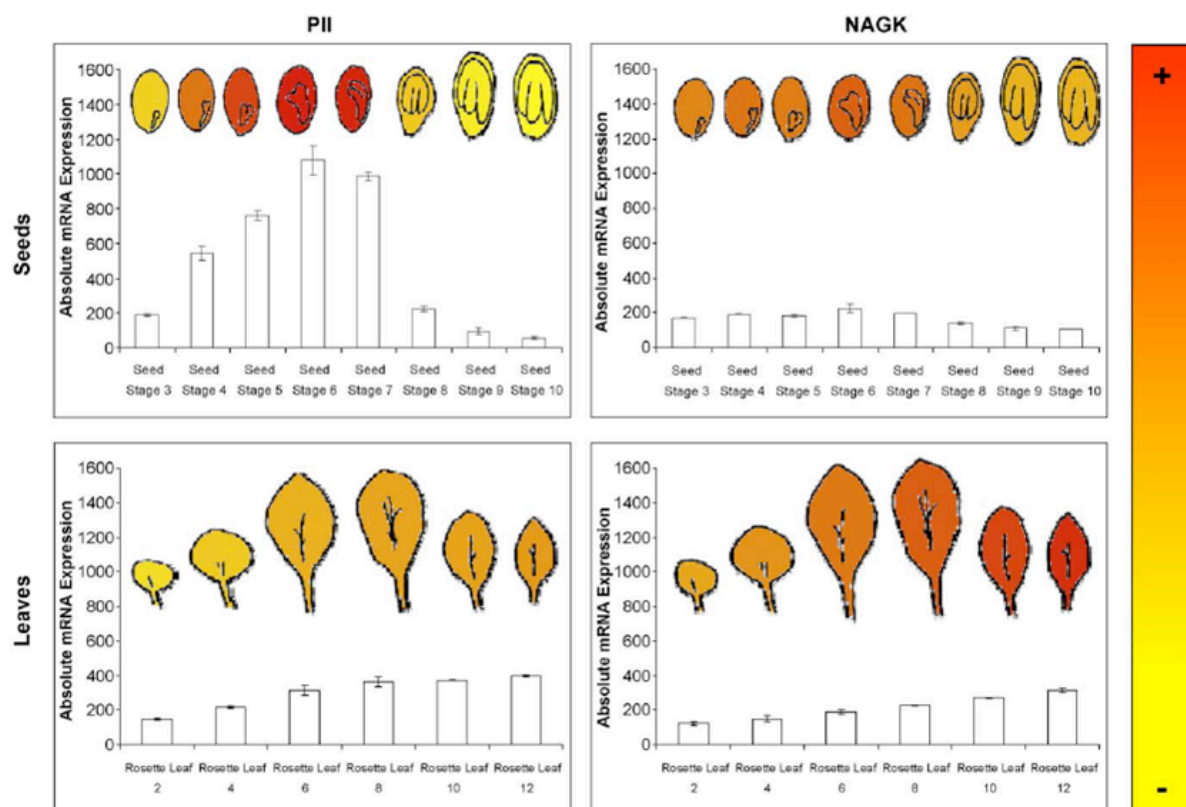


Fig. 35: Analisi di espressione dei trascritti di PII e di NAGK nei semi (in alto) e nelle foglie (in basso). I dati sono riportati in forma grafica con una scala di colorazione che va dal rosso (maggiore quantità di trascritto presente) al giallo (minore quantità). Da Uhrig *et al.* 2009.

Le piante *Brassicaceae*, come *A. thaliana*, accumulano sostanze oleiche sottoforma di triacilgliceroli (TAG), esteri di tre acidi grassi con il glicerolo, che vengono sintetizzati insieme alle proteine di riserva dei semi (SSP) negli embrioni dei semi maturi. Gli embrioni, essendo organi essenzialmente eterotrofi, dipendono, per la loro crescita ed il loro sviluppo, dai nutrienti forniti dalle piante parentali.

In un recentissimo studio effettuato da Baud e collaboratori, è stato visto che WRINKLED1, un fattore di trascrizione noto per indurre l'espressione dei geni della glicolisi e della sintesi degli acidi grassi all'inizio della maturazione dei semi, controlla direttamente l'espressione anche del gene *GLB1* di *A. thaliana* [Baud *et al.* 2010]. Nei mutanti di *A. thaliana wr1* si osservava una *down*-regolazione di *GLB1*, mentre nelle piante transgeniche che *over*-esprimevano *WR1*, si osservava una *over*-espressione anche di *GLB1* (Fig. 36A). Inoltre l'interazione diretta tra *WR1* e il promotore di *GLB1* e di *BCCP1* è stato dimostrato mediante esperimenti di *yeast one-hybrid* (Fig. 36B). Mediante analisi qRT-PCR è stato valutato il profilo di espressione del gene *AtGLB1* in diversi organi vegetativi e riproduttivi (Fig. 36C). Sebbene i livelli relativi di trascritto siano ubiquitariamente presenti, essi sono significativamente più alti negli organi riproduttivi. Nelle silique, aumentano nelle prime fasi della maturazione (6-10 giorni dopo l'antesi), per poi ridursi gradualmente (12-20 giorni dopo l'antesi). Anche analisi di semi isolati da silique hanno mostrato un picco di espressione durante il processo di maturazione dei semi (Fig. 36D). Un'indagine dell'attività spazio-temporale del promotore di questo gene ha mostrato una debole attività nei fiori (Fig. 36Ea), più intensa nel ricettacolo, negli stami e nei granuli pollinici (Fig. 36Eb-c) ed una forte attività negli embrioni in via di sviluppo (Fig. 36Ed-f). Analisi di *immunoblot* ed esperimenti di immunolocalizzazione usando anticorpi rivolti contro PII, hanno permesso di stabilire che i livelli della proteina PII riflettono fedelmente l'accumulo dell'mRNA di *AtGLB1* (Fig. 36F-G). A livello subcellulare, PII è presente nei plastidi degli embrioni maturi (Fig. 36H). Per investigare ulteriormente la funzione di PII nel metabolismo dei composti di riserva nei semi, sono state effettuate delle analisi funzionali dei due mutanti di PII di *A. thaliana*, *PIIV1* e *PIIS2*. Nei semi delle piante mutanti è stato osservato un transiente incremento della produzione degli acidi grassi, nel periodo di maturazione dei semi in cui normalmente (nelle piante *wild type*) la proteina PII è al livello massimo di

espressione. Inoltre, i semi delle piante mutanti mostravano una notevole riduzione della quantità di specie di acidi grassi modificati (a catena lunga e/o insaturi).

Questi risultati sottolineano il ruolo di PII nella fine regolazione della sintesi e della composizione degli acidi grassi nei semi delle piante; questa versatile proteina agisce quindi anche come integratore dei livelli cellulari di C, N ed energia nei semi [Baud *et al.* 2010].

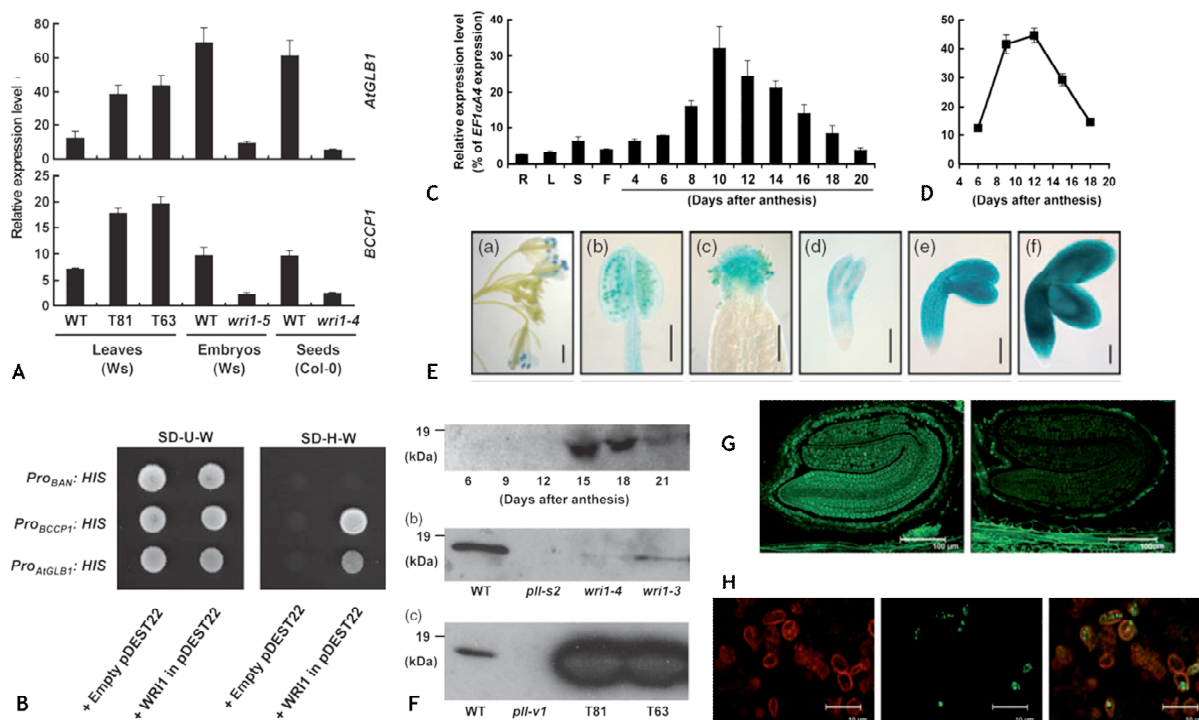


Figura 36: (A) Analisi qRT-PCR di GLB1 e BCCP1 in foglie, embrioni e semi, nella pianta *wild type*, mutante *wr1* e *over-esprimente* WR1 (linee T81 e T63). (B) Esperimenti di *yeast one-hybrid* per analizzare il legame di WR1 sui promotori dei geni *GLB1* e *BCCP1*. I ceppi di lievito che contengono il gene reporter *HIS3* sotto il controllo dei promotori di *BANLUS* (*BAN*, controllo negativo), *BCCP1* e *GLB1*, sono stati trasformati sia con il vettore di espressione vuoto, che con il vettore che permette l'espressione di WR1. (C-D) Analisi qRT-PCR dell'accumulo dell'mRNA di *AtGLB1* in diversi tessuti di *A. thaliana*. (C) R: radici; L: foglie; S: steli; F: fiori; silique in via di sviluppo dai 4 ai 20 giorni dopo l'antesi. (D) In semi in via di sviluppo ottenuti dalle silique. (E) Analisi GUS dell'attività del promotore di *GLB1*. (a) fiori. (b) stame con le due antere. (c) stigma ricoperto di granuli pollinici. (d-f) embrioni in maturazione di 8, 10 e 12 giorni dopo l'antesi. (F) Analisi di *immunoblot* per valutare il *pattern* di accumulo della proteina PII. (a) durante lo sviluppo dei semi (6-21 giorni dopo l'antesi). (b) nei semi di piante *wild type*, mutante *PIIS2*, mutanti *wr1*. (c) nei semi di piante *wild type*, mutante *PIIV1*, *over-esprimente* WR1 (linee T81 e T63). (G-H) Localizzazione spaziale della proteina PII negli embrioni maturi. (G) Analisi al microscopio confocale di una sezione trasversale di una silique di 15 giorni dopo l'antesi. Il segnale verde indica la molecola fluorescente Alexa Fluor 488 coniugata al secondo anticorpo; il primo anticorpo è specifico per PII. A destra è riportata l'immagine del controllo negativo (campione incubato solo con il secondo anticorpo). (H) Co-immunolocalizzazione usando anti-E37 (diretto contro una proteina della membrana plastidiale) o anti-PII come anticorpi primari e Alexa Fluor 488, come anticorpo secondario. Da Baud *et al.* 2010.

1.5 Funzionamento degli stomi e *pathway* di *signalling* coinvolti

1.5.1 I movimenti dell'acqua nelle piante superiori: la traspirazione

All'inizio del XVIII secolo, Stephen Hales, un medico inglese, notava che le piante assorbono una maggiore quantità di acqua rispetto agli animali. Effettivamente, la quantità complessiva di acqua assorbita da ciascuna pianta è enorme, di gran lunga maggiore di quella utilizzata da ciascun animale di peso comparabile. Un animale usa meno acqua in quanto la maggior parte della sua acqua interna viene rimessa in circolo attraverso il suo corpo per più volte, sottoforma (nei vertebrati) di plasma sanguigno e di altri fluidi. Nelle piante, invece, circa il 99% dell'acqua assorbita dalle radici viene rilasciata nell'aria come vapore acqueo, in un processo noto come traspirazione. Tale fenomeno può interessare tutte le parti subaeree del corpo della pianta, anche se le foglie sono di gran lunga i principali organi di traspirazione. La traspirazione è inestricabilmente legata all'approvvigionamento di CO₂ da parte della foglia che è essenziale per la fotosintesi. La traspirazione può essere estremamente dannosa per una pianta. Una traspirazione eccessiva (una perdita d'acqua eccedente l'assorbimento di acqua) ritarda la crescita di molte piante o ne provoca la morte per disidratazione. Le piante hanno sviluppato numerosi adattamenti tesi a minimizzare la perdita d'acqua pur favorendo l'assunzione di CO₂. Le foglie sono ricoperte da una cuticola che rende le loro superfici altamente impermeabili sia all'acqua che all'anidride carbonica. Soltanto una piccola frazione dell'acqua traspirata dalle piante viene perduta attraverso tale rivestimento protettivo esterno, mentre un'altra piccola frazione viene perduta attraverso le lenticelle del sughero. La maggiore quantità di acqua perduta da una pianta vascolare, viene invece rilasciata attraverso gli stomi, delle minuscole aperture presenti nell'epidermide delle foglie e dei fusti [Raven *et al.* 2002].

La traspirazione stomatica comporta due tappe:

1. evaporazione dell'acqua dalle superfici delle pareti cellulari che delimitano gli spazi intercellulari (spazi aeriferi) delle foglie;
2. diffusione del risultante vapore d'acqua dagli spazi intercellulari all'atmosfera attraverso le aperture stomatiche.

1.5.2 Caratteristiche e struttura degli stomi

Tra le cellule epidermiche, generalmente piatte, strettamente addossate l'una all'altra e senza cloroplasti, si trovano sparpagliate le cellule di guardia degli stomi che, invece, contengono cloroplasti (Fig. 37A-D). Queste cellule regolano l'apertura di piccoli pori, o stomi, presenti sulle parti aeree della pianta e quindi controllano i movimenti gassosi, compresi quelli del vapor d'acqua, da e verso gli organi subaerei della pianta. Anche se gli stomi sono presenti su tutte le parti aeree della pianta, essi sono molto più abbondanti nelle foglie. Le cellule di guardia sono spesso associate a cellule epidermiche diverse per forma dalle altre cellule dell'epidermide. Quest'ultime sono dette cellule ausiliarie o annesse. Nello stoma, le pareti adiacenti al poro sono generalmente più spesse di quelle adiacenti alle altre cellule epidermiche. Durante l'ontogenesi, gli stomi possono sporgere o rimanere infossati nella superficie dell'epidermide. Spesso si notano degli spazi vuoti immediatamente al di sotto dello stoma per cui si parla di camera sottostomatica. Gli stomi possono essere presenti su entrambe le facce della foglia oppure solo su un lato, che più comunemente è il lato inferiore (Fig. 37E,F,H), con le dovute eccezioni; le foglie delle piante idrofite infatti, quando galleggiano sulla superficie dell'acqua hanno stomi solo sulla faccia superiore. Le foglie delle xerofite presentano in genere un maggior numero di stomi rispetto ad altre piante, come risultato di un adattamento evolutivo che consente scambi gassosi più rapidi durante i brevi periodi di disponibilità d'acqua. Gli stomi inoltre, possono ritrovarsi in invaginazioni, definite cripte stomatiche, della faccia inferiore della foglia (Fig. 37H), dove spesso si trovano numerosi peli epidermici. Questo adattamento consente di limitare la perdita d'acqua. Nelle dicotiledoni di solito, gli stomi sono disposti sulla superficie della foglia senza alcun ordine preciso (Fig. 37Ga). Il loro differenziamento è sfasato rispetto alla direzione di differenziamento della foglia cosicché, in una foglia in via di sviluppo, stomi maturi e immaturi possono trovarsi fianco a fianco. Nella maggior parte delle monocotiledoni, invece, gli stomi sono disposti regolarmente in file parallele all'asse maggiore della foglia ed il loro differenziamento procede in modo sincrono con la foglia, dall'apice verso la base (Fig. 37Gb). Il numero di stomi può

arrivare anche a cifre molto alte; per esempio, nella pianta *Nicotiana tabacum* (tabacco) vi sono approssimativamente 12000 stomi per cm² di superficie fogliare. Gli stomi sono in comunicazione con un intreccio di spazi aeriferi delimitati all'interno della foglia dalle cellule del mesofillo a pareti sottili. Tali spazi, che costituiscono dal 15 al 40% del volume totale della foglia, contengono aria satura di quel vapore d'acqua che evapora dalle superfici umide delle cellule del mesofillo.

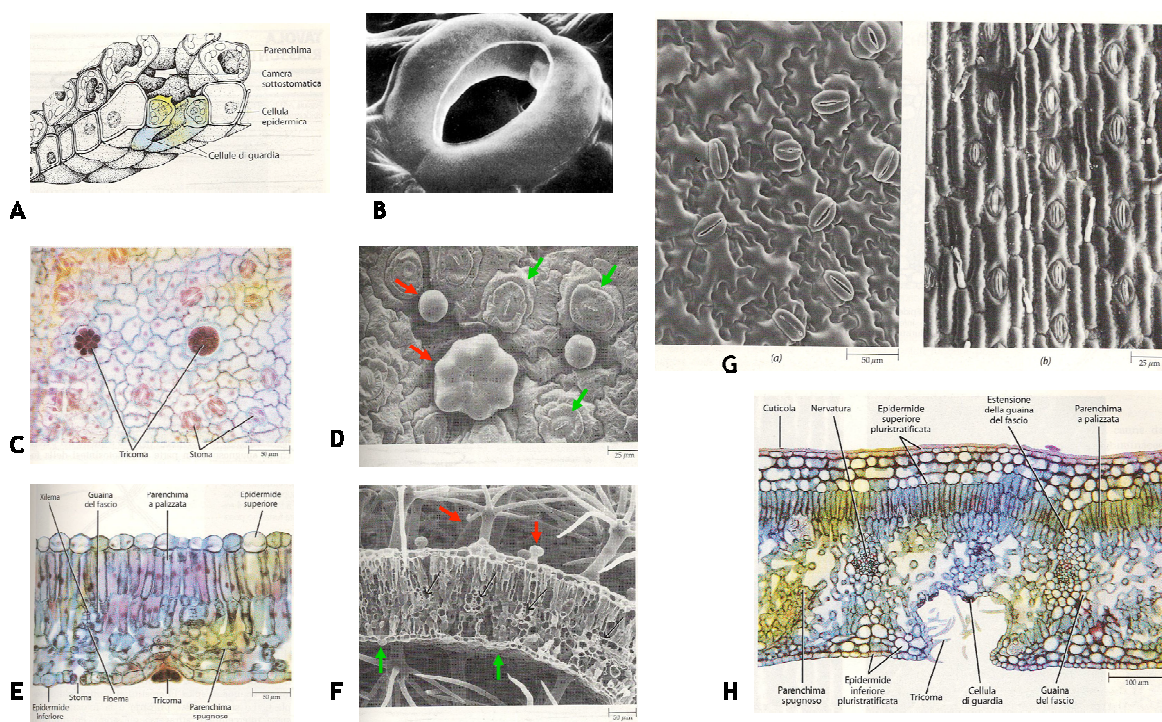


Figura 37: (A) Disegno schematico di uno stoma maturo e delle sue relazioni con l'epidermide e con le cellule parenchimatice adiacenti. (B) Fotografia al microscopio elettronico a scansione che mostra uno stoma aperto nell'epidermide di foglia di *Cucumis sativus* (cetriolo). (C-E) Disegno schematico della superficie dell'epidermide inferiore e della sezione trasversale della foglia di *Syringa vulgaris* (lillà). (D-F) Micrografia al microscopio elettronico a scansione della superficie dell'epidermide inferiore e della sezione trasversale della foglia di *Plectacanthus* (edera). Sono visibili molti stomi con le loro cellule di guardia (indicati con una freccia verde), le cellule ausiliarie e due tipi di tricomi (indicati con una freccia rossa). (G) Microfotografia di epidermidi di foglie di *Solanum tuberosum* (patata) (a) e di *Zea mays* (mais) (b) al microscopio elettronico a scansione. (H) Disegno schematico della sezione trasversale della foglia di *Nerium oleander* (oleandro), una dicotiledone xerofita. La struttura della foglia riflette l'adattamento ad un ambiente povero di acqua; una spessa cuticola ricopre l'epidermide pluristratificata sia superiore che inferiore. Gli stomi ed i tricomi si trovano nelle cripte stomatiche. Da Raven *et al.* 2002.

1.5.3 Il meccanismo di apertura e chiusura degli stomi

I cambiamenti di forma delle cellule di guardia causano l'apertura e la chiusura del poro stomatico. L'apertura dello stoma si verifica quando determinati soluti vengono attivamente accumulati nelle cellule di guardia. L'accumulo dei soluti ed il conseguente abbassamento del potenziale idrico nelle cellule di guardia, causa un movimento osmotico di acqua all'interno delle cellule di guardia e la formazione di una pressione di turgore più elevata di quella delle cellule epidermiche circostanti. La chiusura degli stomi è causata dal processo inverso: in seguito a diminuzione dei soluti nelle cellule di guardia ed al conseguente aumento del potenziale idrico delle cellule di guardia, l'acqua fuoriesce dalle cellule di guardia e la pressione di turgore diminuisce. In questo modo, il turgore viene acquistato o perduto grazie al movimento osmotico passivo di acqua verso l'interno o verso l'esterno delle cellule di guardia secondo un gradiente di potenziale idrico creato, a sua volta, da un trasporto attivo di soluti (Fig. 38A). La struttura della parete della cellula di guardia gioca un ruolo cruciale nei movimenti stomatici. Durante l'espansione delle cellule di guardia appaiate, due peculiarità fisiche permettono che la cellula si incurvi e apra così il poro stomatico. Una di queste peculiarità è l'orientamento radiale delle microfibrille di cellulosa nelle pareti delle cellule di guardia (Fig. 38B). Questa micellazione radiale consente alle cellule di guardia di estendersi, e nello stesso tempo impedisce loro di espandersi lateralmente. La seconda caratteristica si trova all'estremità delle cellule di guardia, dove esse sono in contatto l'una con l'altra. Questa parete in comune conserva una lunghezza quasi costante durante l'apertura o la chiusura dello stoma. Di conseguenza, un aumento della pressione di turgore causa un movimento di allontanamento delle pareti esterne (dorsali) delle cellule di guardia verso l'esterno rispetto alle loro pareti in comune. Quando ciò accade, la micellazione radiale trasmette questo movimento alla parete che delimita il poro (la parete ventrale) ed il poro si apre.

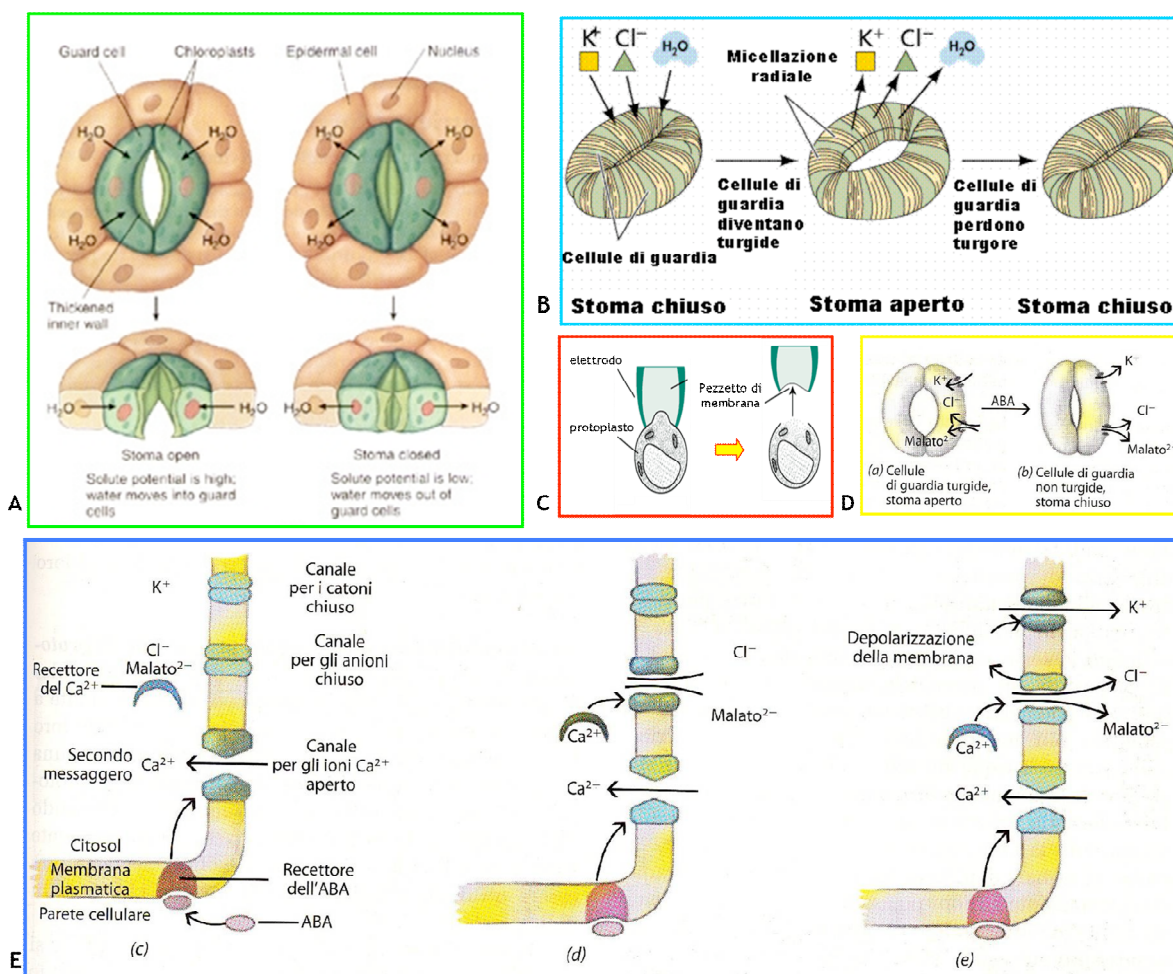
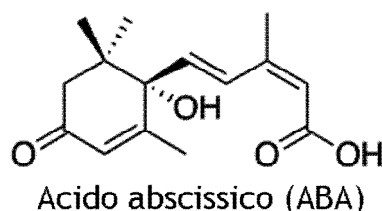


Figura 38: (A-B) Disegno schematico del meccanismo di funzionamento degli stomi. (B) Micellazione radiale delle cellule di guardia. La disposizione radiale delle microfibrille nelle pareti delle cellule vegetali permette il movimento di apertura e chiusura degli stomi. (C) Disegno schematico della tecnica del *Patch-clamp*. (D) Regolazione del movimento degli stomi. (a) La pressione di turgore, causata dall'alta concentrazione di soluto nelle cellule di guardia mantiene aperto il poro. (b) Il rilascio di soluti in risposta all'ABA riduce la pressione di turgore nelle cellule di guardia, determinando la chiusura del poro stomatico. (E) (c) Il legame dell'ABA al suo recettore nella membrana plasmatica determina l'apertura dei canali per gli ioni Ca^{2+} . (d) Gli ioni Ca^{2+} rilasciati nel citosol agiscono come secondi messaggeri per aprire i canali anionici attraverso cui Cl^- e malato $^{2-}$ fluiscono dal citosol verso la parete cellulare. (e) Il risultante abbassamento del potenziale elettrico causa l'apertura dei canali per gli ioni K^+ e permette il loro rilascio nella parete cellulare, con conseguente abbassamento della pressione di turgore nelle cellule di guardia che causa la chiusura degli stomi. Da Raven *et al.* 2002.

1.5.4 Fattori endogeni ed ambientali che influenzano il movimento stomatico

Il grado di apertura dello stoma determina la quantità di gas che viene scambiata attraverso l'epidermide. Vari segnali endogeni o ambientali influiscono sulla dimensione del poro dello stoma. Questi fattori agiscono regolando il contenuto di acqua, o pressione di turgore, delle cellule di guardia. Quando il turgore di una foglia cade al di sotto di un certo valore critico, che può variare a seconda della specie, l'apertura stomatica diventa più piccola. Tuttavia, anche se la perdita d'acqua rimane il fattore, fra tutti gli altri, che maggiormente influenza il funzionamento degli stomi, i movimenti stomatici possono avvenire indipendentemente dal guadagno o dalla perdita di acqua da parte della pianta. L'esempio più importante si trova nelle numerose specie in cui gli stomi si aprono regolarmente al mattino e si chiudono alla sera, anche se non vi sono stati cambiamenti nella quantità di acqua disponibile per la pianta. Uno dei fattori endogeni direttamente coinvolto nella regolazione del movimento stomatico è l'acido abscissico (ABA). In molte piante vi è un aumento marcato del livello di acido abscissico (ABA) durante i periodi di stress idrico.



Quando viene applicato alle foglie, l'ABA causa la chiusura degli stomi in pochissimo tempo. Inoltre, l'effetto dell'ABA sul movimento stomatico è facilmente reversibile. La fuoriuscita di soluti dalle cellule di guardia comincia quando l'ABA prodotto dal mesofillo arriva agli stomi, segnalando che le cellule del mesofillo avvertono di trovarsi in condizioni di stress idrico. La chiusura degli stomi può essere causata anche da ABA prodotto nelle radici, senza alcun cambiamento nello stato idrico o di turgore delle foglie. Mediante esposizioni a terreni aridi, la radice viene stimolata a sintetizzare ABA in eccesso, che verrà in seguito trasportato alle foglie dallo xilema. La concentrazione di ABA nello xilema, e pertanto, il comportamento degli stomi, riflette la possibilità della radice di disporre dell'acqua

dal suolo. L'acido abscissico (ABA) rappresenta per questo, uno dei segnali endogeni particolarmente importanti nel controllo del movimento dello stoma. Il recettore dell'ABA non è stato ancora identificato, ma gli specifici eventi cellulari che entrano in azione nel giro di pochi minuti dall'aggiunta dell'ABA ai protoplasti isolati di cellule di guardia indicano che rapidi cambiamenti nel potenziale osmotico delle cellule di guardia sono mediati dall'ABA. La meccanica dell'apertura di uno stoma è spiegabile, come abbiamo detto, con l'assorbimento di soluti da parte delle cellule di guardia, nelle quali si determina un potenziale osmotico più negativo. I soluti che contribuiscono a far variare il potenziale osmotico delle cellule di guardia sono gli ioni Cl^- e K^+ , pompati attivamente nelle cellule, ed il malato²⁻, ione organico carico negativamente sintetizzato dalle cellule di guardia. Studi condotti usando la tecnica del *Patch-clamp* (tecnica che consente l'analisi elettrica di un piccolissimo pezzo di membrana, *patch*, di protoplasto nudo o di tonoplasto; Fig. 38C) indicano che i canali specifici per gli anioni della membrana plasmatica della cellula di guardia si aprono in risposta all'ABA. Alcuni esperimenti provano che gli ioni Ca^{2+} possono agire in questo caso come secondi messaggeri. Nel modello rappresentato in figura 38D-E, l'ABA attiva i canali per il Ca^{2+} nella membrana plasmatica, determinando un flusso di Ca^{2+} dalla parete cellulare al citosol. Il Ca^{2+} , quindi, causa l'apertura dei canali per gli anioni nella membrana plasmatica attivando proteine chinasi. L'apertura dei canali per gli anioni ha come risultato il rapido movimento di anioni, principalmente Cl^- e malato²⁻, dal citosol alla parete cellulare. La conseguente depolarizzazione della membrana cellulare, la perdita, cioè, della differenza di potenziale elettrico attraverso la membrana cellulare, determina l'apertura dei canali per il K^+ . Ne risulta un movimento di K^+ dal citosol alla parete cellulare. Questo rapido movimento di Cl^- , malato²⁻ e K^+ determina un potenziale osmotico meno negativo (più alto potenziale idrico) nel citosol e un potenziale osmotico più negativo (più basso potenziale idrico) nella parete. L'acqua quindi si muove secondo il suo gradiente di potenziale idrico dal citosol alla parete cellulare facendo ridurre il turgore delle cellule di guardia e causando la chiusura dello stoma. Quando viene rimosso il segnale dell'ABA, le cellule di guardia recuperano lentamente gli ioni K^+ e Cl^- utilizzando un gradiente elettrochimico di protoni generato da una pompa protonica H^+ -ATPasi nella membrana plasmatica. Un potenziale osmotico più negativo si ristabilisce all'interno

delle cellule di guardia facendovi affluire acqua per osmosi, e l'aumento di turgore che ne deriva, determina la riapertura del poro dello stoma [Raven *et al.* 2002].

Fra i fattori ambientali che influenzano il movimento stomatico si trovano la concentrazione di CO₂, la luce e la temperatura. Nella maggioranza delle specie, un aumento di CO₂ causa la chiusura degli stomi. L'ampiezza della risposta alla CO₂ varia significativamente da specie a specie e con il grado di stress idrico a cui la pianta è stata, o continua ad essere, sottoposta. In molte specie, gli stomi si aprono alla luce e si chiudono al buio. Questo può essere in parte spiegato con il fatto che l'utilizzazione fotosintetica dell'CO₂ porta ad una diminuzione del livello di questo gas nella foglia. La luce può, tuttavia, avere un effetto più diretto sugli stomi. È noto da tempo infatti, che la luce nel blu può stimolare l'apertura degli stomi indipendentemente dalla CO₂. Inoltre, nei normali intervalli (da 10° a 25°C), i cambiamenti di temperatura hanno poco effetto sul comportamento stomatico, ma temperature più elevate dei 30-35°C possono portare alla chiusura stomatica. L'aumento di temperatura infatti, causando un aumento della respirazione, porterebbe ad un aumento della concentrazione intercellulare di CO₂ che potrebbe essere la causa effettiva della chiusura stomatica in risposta al calore. Molte piante di climi caldi chiudono i loro stomi regolarmente a mezzogiorno, apparentemente perché accumulano CO₂ nella foglia, e perché le foglie si disidratano in quanto la perdita di acqua per traspirazione eccede l'acquisto di acqua per assorbimento radicale. Gli stomi non sono solo influenzati dai fattori ambientali, ma mostrano anche ritmi regolari giornalieri ogni 24h, di apertura e chiusura che sembra siano controllati da fattori endogeni della pianta; essi mostrano, cioè, ritmi circadiani [Raven *et al.* 2002]. Inoltre l'apertura stomatica è influenzata dall'ossido nitrico (NO), una molecola con effetti dannosi, ma che agisce anche come molecola segnale influenzando la crescita e lo sviluppo delle piante e promuovendo la chiusura stomatica [Lillo *et al.* 2004]. A differenza di quanto avviene per gli animali, non sono ancora chiari i meccanismi che portano alla produzione di NO nelle piante. C'è un ampio *range* di potenziali enzimi che potrebbero generare NO, ma l'omologo dell'NO sintasi (NOS) che a partire dall'arginina porta alla formazione di NO e citrullina non è stato ancora identificato in pianta (Fig. 40). Alcuni studi in letteratura hanno sottolineato l'importanza di enzimi NOS-like per la produzione di NO in pianta, altri

invece suggeriscono che l'enzima NR assume un ruolo di maggior rilevanza. Altri lavori ancora mostrano il coinvolgimento di enzimi completamente differenti. In modo analogo, non sono chiari neppure i meccanismi delle risposte mediate da NO nelle piante. Sebbene sembri chiaro che l'NO nelle piante, così come negli animali, possa portare ad un incremento del segnale cGMP che determina un'alterazione dell'attività dei canali ionici e dell'espressione genica, non si conoscono i precisi meccanismi di funzionamento [Wilson *et al.* 2008]. Infine l'apertura/chiusura degli stomi è regolata anche dalla concentrazione delle poliammine, delle piccole ammine alifatiche, cariche positivamente a pH fisiologico, che giocano un ruolo cruciale in numerosi ed importanti processi biologici sia procariotici che eucariotici [Alcazar *et al.* 2010]. Nelle piante, le poliammine sono state trovate essere implicate in numerosi meccanismi fisiologici come l'organogenesi, l'embriogenesi, la fioritura, lo sviluppo della radice, la maturazione dei frutti ed anche risposte agli stress biotici ed abiotici. I livelli di poliammine generalmente aumentano quando le piante sono sottoposte a vari tipi di stress, anche se le modificazioni nel metabolismo delle poliammine ed i suoi significati fisiologici non sono ancora chiari. Alcuni autori suggeriscono che le poliammine mimino le condizioni di stress bloccando l'apertura degli stomi ed inducendone la chiusura [Liu *et al.* 2000]. Inoltre recenti studi indicano che le poliammine potrebbero agire come segnali cellulari nell'intricata interazione con *pathway* degli ormoni vegetali, incluso l'acido abscissico (ABA) [Alcazar *et al.* 2010]. Le poliammine (PA) più importanti sono la putrescina (Put), la spermidina (Spd) e la spermina (Spm) (Fig. 39).

Questi cationi organici sono sintetizzati, in mammiferi e funghi, seguendo un'unica via biosintetica. Dalla decarbossilazione dell'amminoacido ornitina e per mezzo dell'enzima ornitina decarbossilasi (ODC; EC 4.1.1.17), si arriva alla formazione della molecola divalente putrescina [Alcazar *et al.* 2010]. Le successive poliammine vengono sintetizzate per sequenziali addizioni di gruppi amminopropili alla diammina putrescina. L'enzima spermidina sintasi (SPDS; EC 2.5.1.16) porta alla formazione della triammina spermidina e, successivamente, la spermina sintasi (SPMS; EC 2.5.1.22) forma la tetrammina spermina (Fig. 40). I gruppi amminopropilici provengono dalla decarbossilazione della S-adenosilmetionina

(SAM) per mezzo dell'enzima S-adenosilmetionina decarbossilasi (SAMDC; EC 4.1.1.50), enzima coinvolto anche nella sintesi dell'etilene.

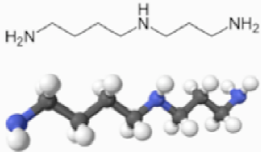
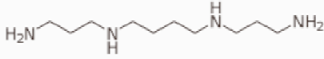
Spermidina	Putrescina	Spermina
		
Nome IUPAC N-(3-aminopropil)butano-1,4-diammina	Nome IUPAC 1,4-diamminobutano	Nome IUPAC N,N'-bis(3-aminopropil)butil-1,4-diammina
Nomi alternativi 1,5,10-triazadecano	Nomi alternativi tetrametilenediamino butano-1,4-diammino	Nomi alternativi gerontina musculammina neuridina
Caratteristiche generali	Caratteristiche generali	Caratteristiche generali
Formula bruta o molecolare $C_7H_{19}N_3$	Formula bruta o molecolare $NH_2(CH_2)_4NH_2$	Formula bruta o molecolare $C_{10}H_{26}N_4$
Massa molecolare (u) 145,246	Massa molecolare (u) 88,15	Massa molecolare (u) 202,34

Figura 39: Formula e caratteristiche chimiche delle principali poliammine: putrescina, spermina e spermidina.

Nelle piante, oltre questa via biosintetica, esiste un'altra via che porta alla formazione della putrescina. Il processo parte dalla decarbossilazione della L-arginina (Arg) ad agmatina (Agm) per mezzo dell'enzima arginino-decarbossilasi (ADC; EC 4.1.1.19); le successive idrolisi, deaminazioni e decarbossilazione di quest'ultima portano alla formazione della putrescina per mezzo degli enzimi agmatina imminoidrossilasi (AIH; EC 3.5.3.12) e N-carbamoilputrescina amidoidrossilasi (CPA; EC 3.5.1.53) (Fig. 40). Comunque il *pool* intracellulare di poliammine libere non dipende solamente dalla loro via biosintetica, ma anche da molti altri processi: la loro degradazione, la quantità di poliammine coniugate ed il loro trasporto [Garufi 2008].

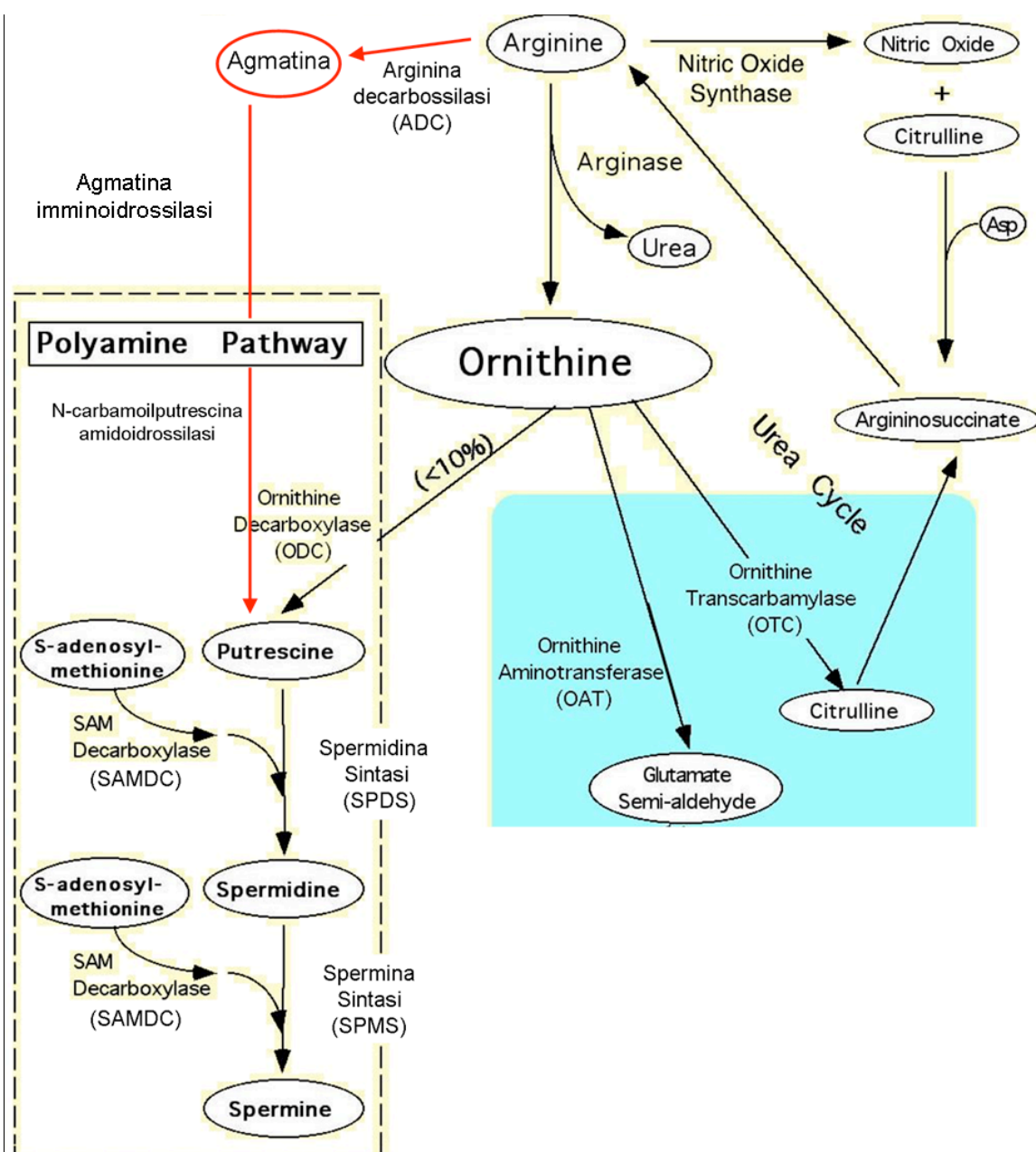


Figura 40: Rappresentazione schematica del metabolismo dell'arginina, dell'ornitina e delle poliammine. Sono indicati i principali enzimi metabolici e metaboliti coinvolti. In rosso è evidenziata la via alternativa per la produzione di putrescina a partire da arginina.

2. IL SISTEMA SPERIMENTALE

2.1 *Lotus japonicus* ed il suo partner simbiotico *Mesorhizobium loti*

Le *Fabaceae* (da *faba* = fava, una delle specie coltivate più antiche) o Leguminose (nome storico, da legume, il tipico frutto di questa famiglia) o anche Papilionacee (da *papilio* = farfalla, per la forma del fiore) sono una famiglia di piante dicotiledoni dell'ordine delle *Fabales*. Con circa 18000 specie, sono una delle più ampie famiglie di piante angiosperme (piante a fiori). Ne fanno parte tra le altre il caiano (*Cajanus indicus*), il fagiolo (*Phaseolus vulgaris*), il pisello (*Pisum sativum*), la fava (*Vicia faba*), il lupino (*Lupinus*) il cece (*Cicer arietinum*), l'arachide (*Arachis hypogea*), la soia (*Glycine max*), la lenticchia (*Lens culinaris*), la cicerchia (*Lathyrus sativus*), l'erba medica troncata (*Medicago truncatula*), il ginestrino (*Lotus corniculatus* e *Lotus japonicus*) ed alberi come l'acacia (*Acacia*), la sofora (*Sophora*), la robinia (*Robinia pseudoacacia*), il carrubo (*Ceratonia siliqua*) (Fig. 41).

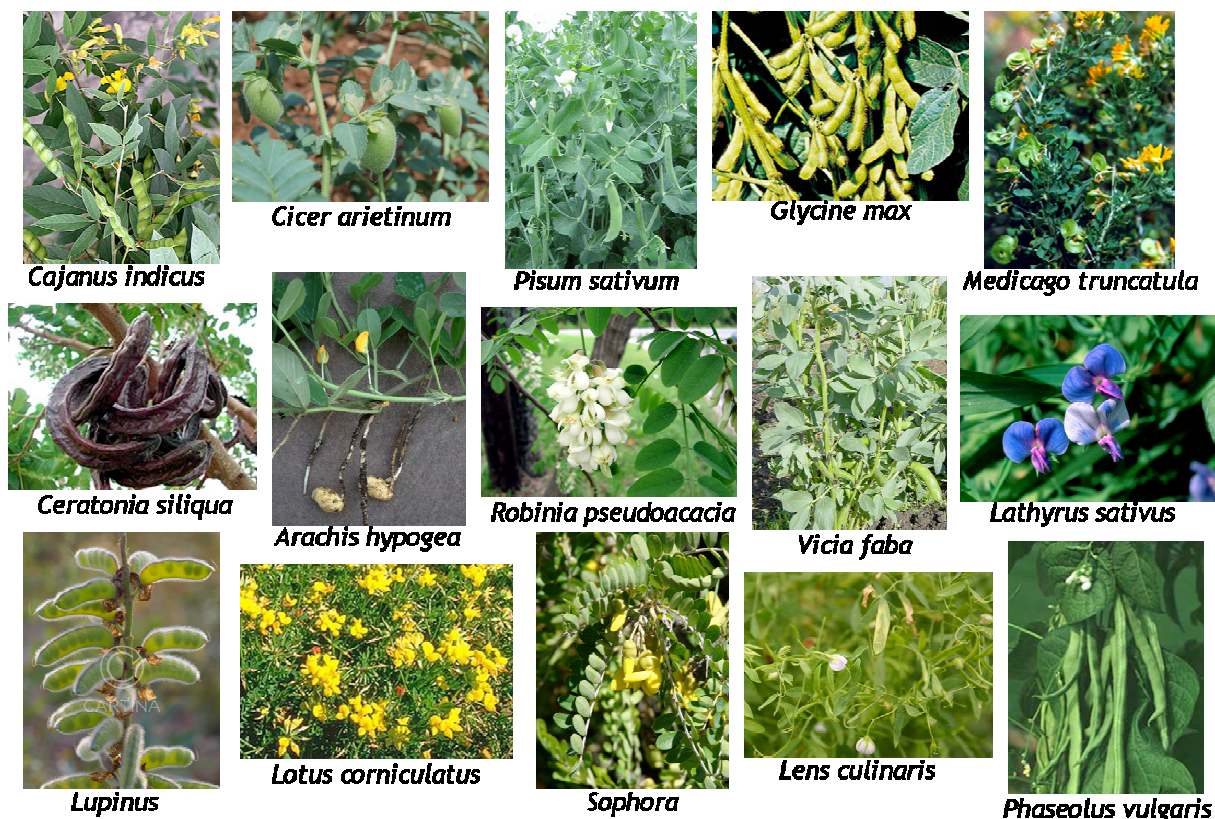


Figura 41: Foto delle principali piante appartenenti alla famiglia delle *Fabaceae* o Leguminose.

L'*habitus* delle varie specie della famiglia può variare da erbaceo, arbustivo od arboreo. Quasi tutte le specie inoltre, presentano foglie composte (in cui il lembo è suddiviso in foglioline, ciascuna delle quali ha un proprio picciolo), pennate o palmate. Le *Fabaceae* hanno una diffusione eccezionalmente ampia, estesa a tutti i continenti fino alle terre più isolate, con capacità di adattamento agli *habitat* più disparati [Raven *et al.* 2002].

La caratteristica comune a tutte le specie della famiglia è il tipico frutto, definito baccello o legume. Il baccello è un frutto secco, monocarpellare e deiscente (in cui i tessuti della parete dell'ovario si aprono a maturità lasciando fuoriuscire i semi); alcune volte presenta strozzature che lo suddividono in camere: in questo caso il legume è detto lomento (ad esempio il frutto dell'arachide). Altra caratteristica comune a molte leguminose è la capacità di instaurare una simbiosi endomutualistica con i batteri rizobi che sono in grado di fissare l'azoto atmosferico, in un caratteristico organo vegetale definito nodulo. Esistono due tipi ben distinti di noduli radicali: nei noduli a crescita indeterminata, quali troviamo ad esempio in *Pisum* e nelle leguminose che vivono in regioni temperate, la regione meristemica da cui si sviluppa l'organo è apicale e continua ad essere attiva durante tutta la fase di sviluppo del nodulo, che per questa ragione assume una forma cilindrica; i noduli a crescita determinata, tipici ad esempio di *Phaseolus* e di leguminose che vivono in regioni tropicali, sono invece sferici con un meristema con un'attività limitata nel tempo, ed il cui sviluppo radiale è principalmente legato all'ingrandimento delle cellule [Ramellini 2009].

Le leguminose sono piante di grande importanza in quanto esse rappresentano circa un terzo della produzione colturale mondiale delle proteine rivolte all'alimentazione umana, degli oli di origine vegetale e costituiscono la maggiore risorsa per il nutrimento del bestiame d'allevamento e del materiale allo stato grezzo per l'industria. Inoltre, le piante che appartengono a questa famiglia, sono un componente chiave per sistemi di agricoltura sostenibile e sono definite piante "pioniere" (capaci di colonizzare per prime terreni relativamente poco fertili) in virtù della loro capacità di instaurare con successo la simbiosi azoto-fissativa, che fornisce a queste piante, a quelle ad esse associate ed a quelle che crescono successivamente nello stesso terreno, una risorsa continua di azoto. Le leguminose sono anche in

grado di stabilire simbiosi mutualistiche con i funghi micorrizici del suolo (come *Gigaspora margarita* e *Glomus intraradices*) che le rendono in grado di estrarre acqua, fosforo ed altri nutrienti essenziali dal suolo con maggiore efficienza.

Le piante leguminose hanno sempre giocato un ruolo chiave nella ricerca in campo biologico; un tipico esempio è rappresentato dal lavoro di Mendel sulla pianta comune di pisello che ha fornito i fondamenti della genetica moderna. Il lavoro di Mendel ha anche sottolineato l'importanza della scelta di un'adeguata specie modello per la ricerca scientifica. Mentre la pianta diploide di pisello è stato un ottimo sistema modello per lo studio della genetica classica, le grosse dimensioni del suo genoma, insieme con altre caratteristiche meno ottimali, hanno rallentato ed ostacolato l'isolamento e la caratterizzazione di geni fondamentali nello studio della biologia delle leguminose e nell'agricoltura. Per questa ragione un'altra Fabacea, *Lotus japonicus*, è stata scelta come pianta modello per la ricerca applicata alle leguminose circa 20 anni fa (Fig. 43A). Grazie a questo, in Europa e nel mondo, sono stati sviluppati numerosi metodi e protocolli per facilitare la ricerca di base su questa specie. Una enorme quantità di articoli scientifici focalizzati sullo studio di *Lotus japonicus* sono stati pubblicati, molti dei quali innovativi. Tra le più importanti scoperte ottenute dalla ricerca su quest'organismo modello, si può annoverare l'isolamento dei geni con ruoli cruciali nel processo della simbiosi, che ha fornito sorprendenti nuovi spunti sulla natura e sull'evoluzione dei meccanismi di segnale coinvolti nell'interazione pianta-microrganismo. Nel tempo sono state raccolte numerose informazioni relative a sequenze EST depositate in banche dati, inoltre la disponibilità di *marker* molecolari e fenotipici e la disponibilità di "*facilities*" come *Tilling* e *Chips* per *Affimetrix*, rendono tale sistema particolarmente appetibile e adatto a studi sia di tipo molecolare che fisiologico. Attualmente è stato ultimato il progetto genoma di *Lotus japonicus* e la sequenza genomica, quasi completa, è disponibile in rete al sito <http://www.kazusa.or.jp/lotus/>.

Lotus japonicus è stata proposta come pianta modello a causa di numerose caratteristiche. Queste includono le piccole dimensioni (20-30 cm di altezza), la ridotta grandezza del genoma diploide (472 Mb, diviso in 6 coppie di cromosomi), la quantità dei fiori, la relativa semplicità dell'impollinazione manuale, l'elevata produzione di semi (circa 1000 per pianta), il breve ciclo vitale (circa 3 mesi), l'auto-

fertilità, le semplici procedure di coltivazione *in vivo*, l'attitudine alla manipolazione, alla trasformazione ed alla rigenerazione *in vitro* [Sato *et al.* 2008]. A differenza della maggior parte delle leguminose, *Lotus japonicus* infatti, non risulta recalcitrante alla trasformazione genetica mediata da *Agrobacterium tumefaciens* ed *Agrobacterium rhizogenes*. *L. japonicus* è una pianta perenne di ambiente tropicale, il cui habitat naturale è l'Asia centrale, inclusa l'area del Giappone, della Corea e della Cina, in cui sono stati trovati diversi ecotipi con variabilità fenotipica e genetica. L'ecotipo utilizzato nei nostri esperimenti è GIFU F9, la cui sigla deriva dalla sua localizzazione geografica; esso cresce infatti nel bacino del fiume Gifu nell'isola di Honshu in Giappone e venne isolato per la prima volta dal professore Hyrayoshi dell'università di Kyoto (Fig. 42).

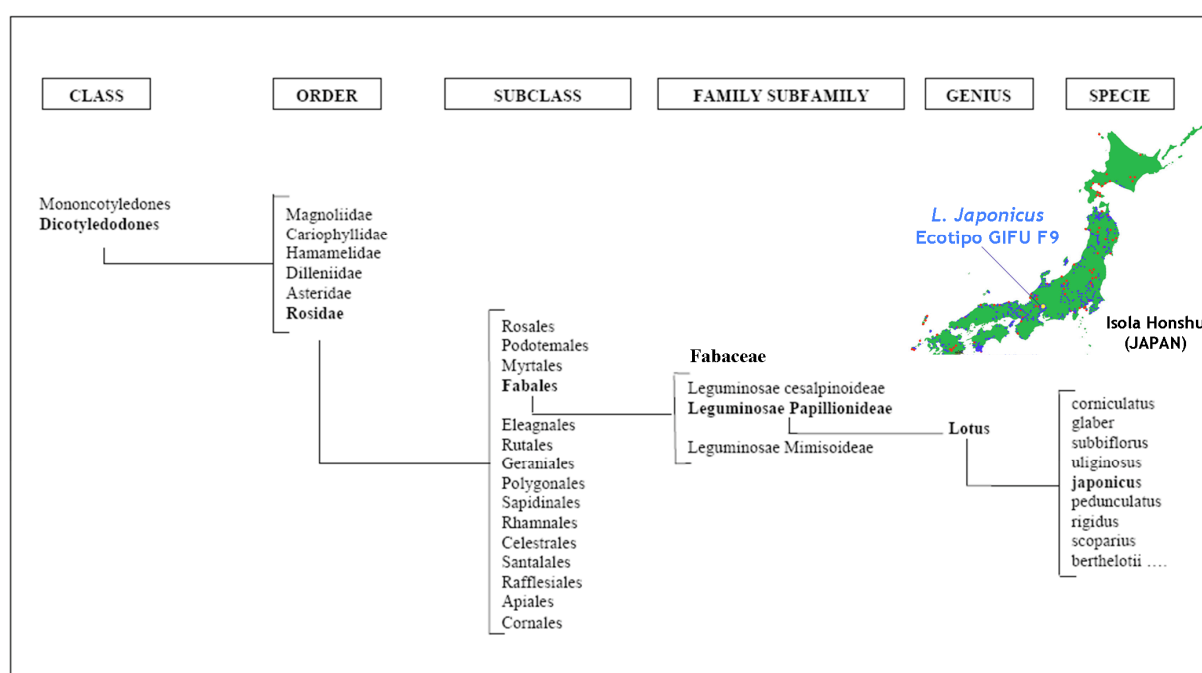


Figura 42: Classificazione tassonomica della pianta leguminosa modello *Lotus japonicus*. Uno degli ecotipi più utilizzati nei laboratori è GIFU F9, isolato in Giappone.

Questa leguminosa modello è una pianta perenne a fusto pieno e ricurvo alla base, alta da 10 a 30 cm (Fig. 43A). Le foglie sono composte e pentafoliate: sono divise in tre foglioline romboidali (*trifolium*) e due foglioline alla base del picciolo che assomigliano a stipole (Fig. 43E). I fiori, gialli o rossi sono riuniti in ombrellette di 2-6 elementi (Fig. 43B,H). I frutti, legumi, sono sottili e cilindrici, lunghi circa 3 cm, di

colore brunoastro a maturità (Fig. 43C-D). All'interno i semi sono disposti linearmente lungo l'asse, in numero di venti circa per baccello (Fig. 43F) [Raven *et al.* 2002]. *Lotus japonicus*, così come la maggior parte delle piante leguminose, è in grado di instaurare un rapporto di simbiosi mutualistica con i batteri rizobi. In particolare il suo partner simbiotico è *Mesorhizobium loti*, un batterio azoto-fissatore del suolo gram-negativo, in grado di formare noduli determinati sulle radici della pianta (Fig. 43G,L).

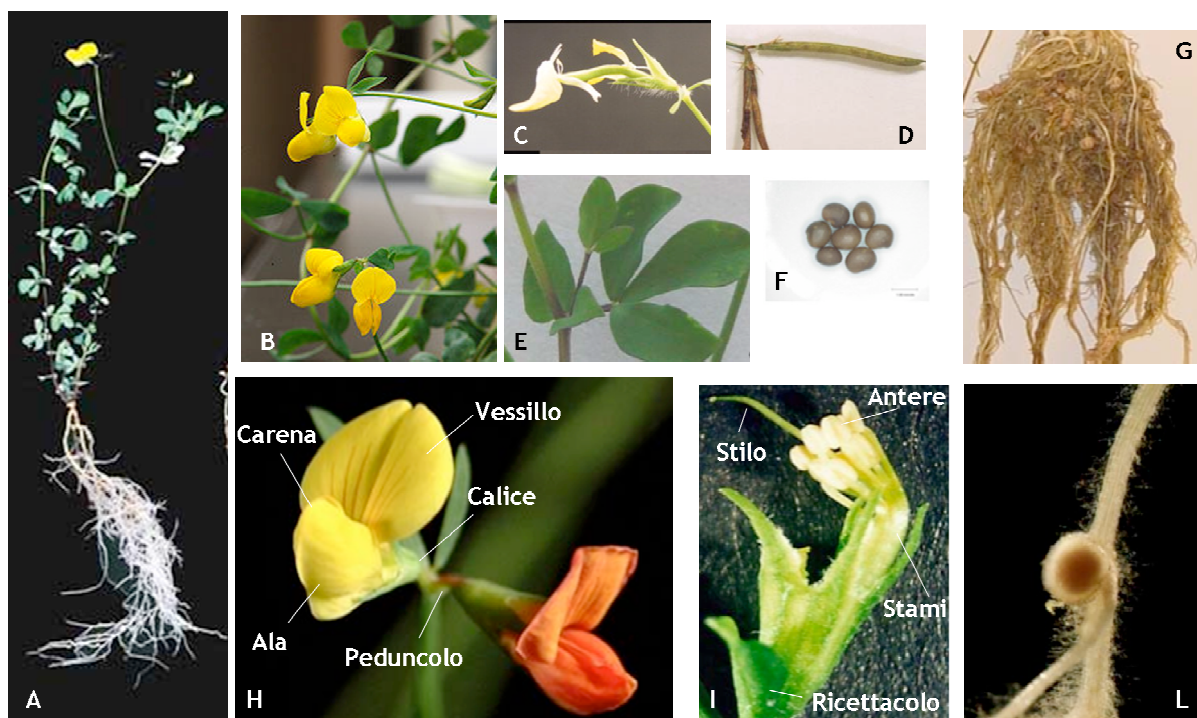


Figura 43: Diversi organi vegetali della pianta leguminosa modello *L. japonicus*. (A) Intera pianta (B) Porzione aerea. (C) Baccello immaturo in formazione. Si possono notare i petali (vessillo, ala e carena) secchi che si stanno separando avendo svolto la funzione di protezione delle strutture riproduttive. (D) Baccelli maturi e secchi contenenti circa 20 semi. (E) Foglia composta e pentafoliata: divisa in tre foglioline romboidali (*trifolium*) e due foglioline alla base del picciolo che assomigliano a stipole (F) Semi. (G) Sistema radicale di una pianta di circa 2 mesi: si possono notare i noduli azoto-fissatori. (H) Fiori degli ecotipi Gifu (giallo) e Filicaulis (rosso). Sono indicate le principali porzioni visibili del fiore. (I) Fiore aperto privato dei petali (carena, ala e vessillo). Sono indicati gli organi riproduttivi. (L) Nodulo radicale maturo.

L. japonicus è in grado di entrare in simbiosi oltre che con *M. loti*, anche con *Bradyrhizobium loti*, ma quest'ultimo induce sulle sue radici, la formazione di noduli morfologicamente normali ma incapaci di ridurre l'azoto atmosferico (Nod⁺ Fix⁻). La capacità di ridurre l'azoto manca anche nel caso dell'infezione con *Rhizobium etli* (il partner simbiotico di *Phaseolus vulgaris*) a causa della mancata invasione delle cellule corticali con conseguente rapida senescenza dei noduli [Banba *et al.* 2001]. *M. loti* è

invece in grado di portare alla formazione di noduli maturi in cui viene fissato correttamente l'azoto. Il sequenziamento di *Mesorhizobium loti* è stato completato nel 2000 e ha evidenziato come il genoma sia formato da un unico cromosoma (7.036,074 bp) e due plasmidi rispettivamente denominati pMLa (351,911 bp) e pMLb (208,315 bp). I geni per la nodulazione e la fissazione dell'azoto sono localizzati sul cromosoma batterico. I ceppi di *Mesorhizobium loti* comunemente utilizzati in laboratorio sono: R7A, NZP2235, JRL501, MAF303099 e TONO. Gran parte di questi ceppi sono stati ingegnerizzati con geni *reporter* quali la *GFP* o *lacZ*, costitutivamente espressi, per permettere l'analisi dell'infezione dai primi istanti dell'induzione della simbiosi sino allo sviluppo del nodulo.

2.2 La simbiosi azoto-fissativa: interazione mutualistica tra rizobi e leguminose

Sono molti i casi di simbiosi, in cui nel corso dell'evoluzione biologica, due o più organismi hanno intrapreso la via di una convivenza sempre più intima e profonda, fino ad integrarsi in un solo organismo (*e pluribus unum*), come è accaduto – paradigmaticamente – con la genesi degli eucarioti. Lo studio delle simbiosi sta guadagnando sempre più interesse in ambito biologico ed ecologico: da curiosa, simpatica ma tutto sommato limitata eccezione, la simbiosi si sta gradualmente rivelando come un fenomeno del tutto generale e fondamentale per gli organismi, relegando l'idea di una vita in *splendid isolation* alle innaturali condizioni di laboratorio [Ramellini 2009]. I batteri che vivono come endo-simbionti nelle radici delle piante, sono di gran lunga i più importanti in termini di quantità di azoto fissato. I più comuni batteri simbiotici azoto-fissatori sono quelli che appartengono ai generi *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium*. Questi batteri sono ospiti delle radici di piante leguminose quali *Medicago sativa* (erba medica), *Trifolium* (trifoglio), *Pisum sativum* (pisello), *Glycine max* (soia), *Phaseolus* (fagiolo), *Lotus japonicus*. Nell'associazione simbiotica tra batteri e leguminose, i batteri forniscono alla pianta l'azoto in una forma utilizzabile per la sintesi delle proteine. La pianta, a sua volta, fornisce ai batteri sia una fonte di energia per la loro attività di fissazione dell'azoto, sia le molecole contenenti carbonio per la produzione dei composti azotati. Questi

batteri azotofissatori, comunemente chiamati rizobi, penetrano nei peli radicali delle leguminose innescando una serie di reazioni che portano alla formazione di un nuovo organo vegetale: il nodulo radicale (Fig. 44A-B).

L'interazione simbiotica avviene fisicamente fra i peli radicali di una specifica regione della radice (zona di competenza) e i rizobi che si trovano nella rizosfera (Fig. 44C). Solo i peli radicali di questa regione e non quelli della parte più giovane della radice né tantomeno quelli della regione più vecchia che hanno già completato il processo di allungamento, sono competenti per rispondere all'infezione dei rizobi con la formazione del nodulo radicale. Il processo simbiotico comincia con l'adesione del batterio al pelo radicale emergente. I peli radicali si sviluppano come strutture strettamente incurvate che intrappolano il rizobio (Fig. 44D-E). L'invasione dei peli radicali e delle sottostanti cellule corticali da parte dei rizobi avviene mediante i filamenti o tubi di infezione, strutture tubulari formate dalla progressiva crescita verso l'interno della parete cellulare dei peli radicali a partire dal punto di penetrazione [Raven *et al.* 2002]. Un singolo pelo radicale può essere infettato da più rizobi, e quindi, può contenere più filamenti d'infezione. Il batterio simbionte induce anche la divisione cellulare in regioni localizzate della corteccia, nelle quali penetra mediante la crescita e la ramificazione del filamento d'infezione. I rizobi del filamento di infezione vengono rilasciati in involucri che derivano dalla membrana plasmatica delle cellule ospiti e si sviluppano in batteroidi, rizobi di grosse dimensioni che fissano l'azoto. La proliferazione delle cellule corticali della radice, genera la formazione di strutture definite noduli. L'associazione tra un batterio rizobio ed una pianta leguminosa è altamente specifica. Le interazioni tra i partner della simbiosi implicano un intricato scambio di segnali molecolari che regolano l'espressione di geni essenziali per l'infezione e per la formazione del nodulo. Per la formazione dei noduli azoto-fissatori sono necessari due gruppi di geni batterici. Un gruppo, i geni *nod*, è implicato nella risposta ospite-specifica e nella formazione del nodulo, e l'altro, i geni *nif*, è implicato nella fissazione dell'azoto. L'innescò della relazione simbiotica si ha quando la pianta leguminosa in condizioni di stress abiotico, come la carenza di N, comincia a secernere una serie di molecole fenoliche e di flavonoidi, come la cetina, l'apigenina, la narigenina e la luteolina; esse mediante legame sono capaci di indurre l'espressione del gene batterico *nodD*. I prodotti del

gene *nodD* inducono l'espressione di altri geni *nod* batterici i cui prodotti sono richiesti per la formazione dei cosiddetti Fattori di Nodulazione (*Nod Factors*). L'operone dei geni *nod* batterici è localizzato sui plasmidi *Sym* (da simbiosi) ed è composto da geni *nod* comuni (*nodA, B, C, I, J*) e geni ospite-specifici (*nodE, F, P, Q, H, L*) (Fig. 44G). I fattori Nod sono dei lipo-chitino-oligosaccaridi che fungono da elicitori per l'avvio dell'organogenesi del nodulo azoto-fissatore nella pianta. Essi sono formati da uno scheletro carbonioso costituito da 4 o 5 residui di β -1,4-N-acetilglucosammina con una lunga catena acilica legata alla glucosammina terminale (Fig. 44F). I geni *nod* ospite-specifici sono responsabili delle modificazioni dello scheletro carbonioso dei fattori Nod. In particolare il numero di residui di glucosammina, la lunghezza delle catene di acidi grassi saturi legati all'estremità non riducente della catena di zuccheri ed il tipo di sostituito legato all'altra estremità (gruppo sulfonilico, metilico, fucosilico, arabinosilico ed altri), determinano la specificità d'ospite dei fattori Nod. L'aggiunta dei fattori Nod induce una cascata di eventi che si susseguono temporalmente (Fig. 44H). Inizialmente si ha una depolarizzazione transiente della membrana, che è il risultato di un influsso di ioni calcio a partire dal mezzo esterno. Quest'influsso di Ca^{2+} è immediatamente seguito da un efflusso di Cl^- e K^+ con conseguente alcalinizzazione del citoplasma. A distanza di pochi minuti dall'aggiunta di fattori Nod, vengono indotte oscillazioni nelle concentrazioni citosoliche del calcio, nelle vicinanze del nucleo del pelo radicale, fenomeno noto come *Ca²⁺-spiking*. Solo a distanza di almeno tre ore avviene il riarrangiamento citoscheletrico, legato ai cambiamenti della polimerizzazione dell'actina, associato alla deformazione del pelo radicale, che è il primo evidente segno dell'inizio della simbiosi. Nella zona apicale del pelo radicale si osserva la formazione della cosiddetta zona lucida del citoplasma in cui non sono presenti organelli di alcun tipo e che preclude l'inizio dell'allungamento dei peli. La deformazione del pelo radicale, (fenotipo Had, *hair deformation*) avviene per un processo di re-inizio di crescita a livello della punta del pelo radicale. Alla deformazione fa seguito l'arricciamento (fenotipo Hac, *hair curling*) in cui i batteri vengono intrappolati all'interno del pelo e, idrolizzandone la parete vegetale, cominciano ad invaderlo. L'invasione avviene all'interno del tubo d'infezione che si origina dalla deposizione intorno ai batteri, di materiale proveniente dalle pareti

cellulari vegetali. Il tubo di infezione ha il ruolo di separare il sito in cui i batteri proliferano dal resto dei tessuti vegetali. Questa separazione fisica, che viene conservata anche nelle fasi successive in cui si ha la fissazione dell'azoto, è probabilmente legata al fatto che in questo modo il batterio viene riconosciuto dalla pianta come simbionte, evitando di far partire i meccanismi di difesa contro i patogeni. Mentre il canale d'infezione allungandosi raggiunge le cellule corticali queste si de-differenziano e re-iniziano a dividersi permettendo la formazione del primordio del nodulo.

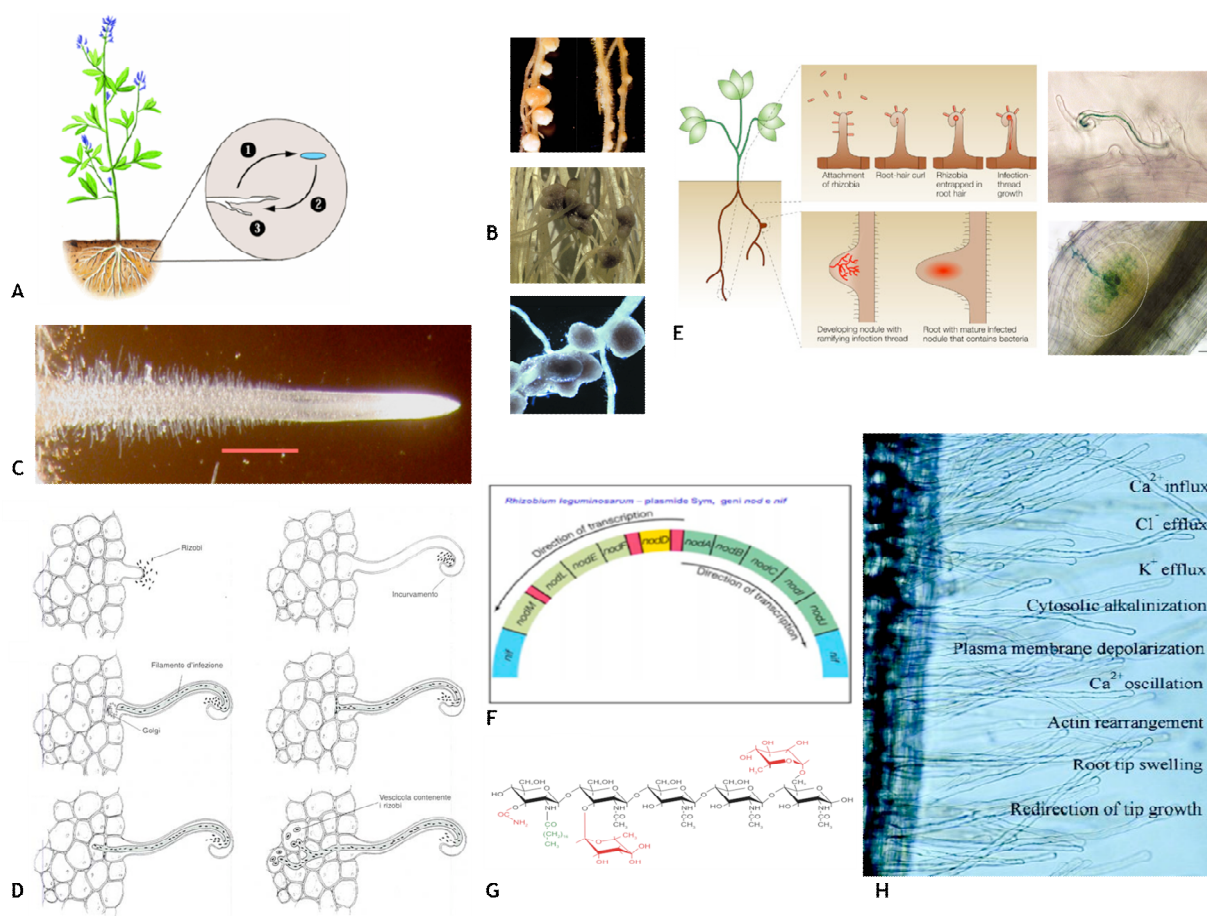


Figura 44: Schematizzazione degli eventi precoci che portano alla formazione del nodulo. (A) Riconoscimento reciproco fra i simbionti. 1: le radici delle piante rilasciano elicitori per la sintesi dei geni *nod*; 2: i batteri rilasciano i fattori Nod; 3: le radici vegetali percepiscono i fattori Nod, comincia l'infezione e si innesca il processo di morfogenesi del nodulo. (B) Foto di noduli azoto-fissatori. (C) La porzione della radice competente alla nodulazione è indicata dalla barra rossa. (D) Disegno degli eventi che portano alla deformazione ed all'arricciamento del pelo radicale, lo sviluppo del canale di infezione e la proliferazione dei batteri nelle cellule corticali. (E) Rappresentazione schematica e rispettive foto al microscopio ottico dei primi stadi dell'infezione dei peli radicali, formazione dei tubi di infezione e sviluppo del primordio nodulare. Da Oldroyd e Downie 2004. (F) Struttura del plasmide *Sym* contenente l'operone dei geni *nod*. (G) struttura dei fattori Nod secreti da *M. loti*. Da Oldroyd e Downie 2008. (H) Schematizzazione dei cambiamenti fisiologici che avvengono precocemente nei peli radicali successivamente all'aggiunta di fattori Nod.

Quando il canale d'infezione si ramifica avviene il rilascio di tali batteri nelle singole cellule corticali mediante endocitosi (Fig. 44D). I batteri infatti vengono rivestiti da una membrana di origine vegetale, denominata membrana peri-batteroidale, che forma il simbiosoma, all'interno del quale i batteri smettono di dividersi, si differenziano in batteroidi ed acquisiscono la capacità di fissare l'azoto [Oldroyd e Downie 2008].

3 SCOPO DEL LAVORO

3.1 Investigazione del ruolo svolto dalla proteina PII della leguminosa modello

Lotus japonicus

Le piante terrestri, essendo organismi viventi di tipo sessile, necessitano di un metabolismo altamente flessibile che permetta loro di sopravvivere in condizioni ambientali in continuo cambiamento. L'interazione tra i metabolismi di carbonio (C) ed azoto (N) al variare dei parametri ambientali e di sviluppo, richiede un rigoroso coordinamento di tutti i *pathway* metabolici coinvolti. Questo interessa un ampio *range* di meccanismi di regolazione trascrizionali e *post*-trascrizionali che modulino il metabolismo delle piante con tempistiche molto precise [Baud *et al.* 2010].

Gli eucarioti fototrofi, come le piante superiori, presentano dei meccanismi molto complessi per la regolazione del metabolismo di carbonio ed azoto. A causa della loro natura pluricellulare e della specializzazione dei tessuti, la richiesta di questi elementi per le cellule vegetali, può variare enormemente a seconda del tipo di tessuto, richiedendo una precisa cooperazione tra cellule di tessuti diversi [Uhrig *et al.* 2009]. Ad esempio l'azoto assorbito dalle radici sottoforma di nitrato, può essere ridotto localmente a nitrito e quindi usato nel metabolismo dell'azoto nelle radici, oppure può essere trasportato verso i tessuti fotosintetici per essere incorporato negli aminoacidi o in altre biomolecole azotate. Allo stesso modo, il carbonio può essere fissato localmente ed incorporato negli scheletri carboniosi o traslocato dai tessuti fotosintetici, sottoforma di saccarosio, ai tessuti radicali per fornire gli scheletri di carbonio e l'energia necessaria per il processo di assimilazione dell'azoto. Alla base della sinergia cellulare metabolica tra carbonio ed azoto c'è un complesso *network* di segnali che consistono in molecole di piccole dimensioni (come gli aminoacidi), proteine segnale (come chinasi e fosfatasi) ed interattori di proteine di regolazione. Tutti questi segnali esercitano un controllo metabolico complessivo andando a regolare l'espressione genica oppure le attività di proteine mediante modificazioni post-traduzionali o interazioni con effettori allosterici.

3.2 Possibile ruolo di PII nel controllo del corretto rapporto C/N nel processo di Simbiosi azoto-fissativa

Questa complessa rete di controllo che passa attraverso il *sensing* di particolari segnali azotati e carboniosi e la loro trasduzione deve essere anche al centro della regolazione del processo simbiotico fra rizobi e piante leguminose. Infatti, l'interazione simbiotica tra i batteri che appartengono al gruppo dei rizobi e le piante leguminose è un processo biologico in cui le risorse metaboliche carboniose ed azotate vengono gestite in maniera estremamente fine per consentire alla pianta di trarre il maggior vantaggio possibile da questa interazione estremamente dispendiosa. È quindi lecito immaginare che, per analogia con quanto dimostrato nei procarioti, proteine PII-like potrebbero avere un importante coinvolgimento anche nella regolazione di questo processo [Arcondeguy *et al.* 2001]. Un ruolo di PII nel controllo della efficienza di fissazione dell'azoto dei rizobi durante l'interazione simbiotica è stato già largamente dimostrato nel simbionte batterico. Nel batterio *Rhizobium leguminosarum*, il promotore del gene *glnB* è *down-regolato* durante il processo di differenziazione per diventare batteroide, nel momento che coincide con l'arresto della divisione batterica e con il passaggio da un metabolismo azotato di tipo assimilativo (in cui il batterio utilizza le risorse azotate per la propria crescita e riproduzione) ad uno di tipo fissativo (in cui l'azoto fissato va trasferito interamente alla pianta) [Ercolano *et al.* 2001]. Anche la caratterizzazione del mutante di delezione *glnB* e del mutante Y51F in *Sinorhizobium meliloti*, indicava un coinvolgimento di GlnB nello sviluppo e funzionamento del nodulo. Entrambi i mutanti esibivano un simile fenotipo simbiotico, anche se un po' più forte per *glnB* Y51F, con difetti dell'infezione batterica dell'erba medica e noduli eterogenei in piante di 3 settimane. Le piante erano clorotiche malgrado fossero capaci di ridurre l'azoto atmosferico a livelli apprezzabili. Con l'aggiunta di ammonio al mezzo di coltura, la clorosi veniva eliminata, confermando che le piante soffrivano di carenza di azoto, nonostante l'elevato livello di attività della nitrogenasi. Questo paradossale fenotipo Nif⁺ Fix⁻, poteva essere spiegato dal coinvolgimento di GlnB nella regolazione del trasportatore dell'ammonio del batteroide [Arcondeguy *et al.* 1997]. Il ruolo critico

della proteina AmtB nello sviluppo del nodulo è stato dimostrato anche in *Rhizobium etli* [Tate *et al.* 1998]. Come abbiamo detto nel primo paragrafo inoltre, recenti dati di letteratura dimostrano che la proteina PII nei batteri azotofissatori ha un ruolo chiave nella fissazione dell'azoto, interagendo con le proteine NifA/NifL, responsabili dell'espressione dei geni *nif*, e regolando l'attività dell'enzima nitrogenasi [Forchhammer 2008].

L'azoto ridotto non rappresenta solo il prodotto finale della fissazione biologica dell'azoto ma anche un importante segnale che è in grado di regolare la formazione, lo sviluppo ed il funzionamento del nodulo azoto-fissatore. Infatti, la pianta leguminosa in presenza di adeguate disponibilità azotate nel terreno di crescita, preferisce utilizzare direttamente queste ultime, trasportandole all'interno della radice con sofisticati sistemi di *uptake* e quindi assimilarli principalmente attraverso la via GS/GOGAT. La carenza di azoto è quindi una condizione propedeutica all'inizio dell'interazione simbiotica e l'eccesso di fonti azotate viene percepito dalla pianta con meccanismi ancora poco noti [Barbulova *et al.* 2007; Omrane *et al.* 2009] determinando un blocco precoce dell'organogenesi del nodulo. Allo stesso modo, l'aggiunta di azoto al mezzo di crescita in fasi più tardive, è in grado di bloccare lo sviluppo e/o il funzionamento del nodulo. In altre parole, la pianta è sempre vigile nel controllo del corretto rapporto fra azoto fissato dal simbionte batterico attraverso il processo estremamente dispendioso della fissazione dell'azoto atmosferico, e la quantità di fotosintato che deve essere allocato al nodulo per lo svolgimento dell'attività nitrogenasica.

Uno degli approcci sperimentali da me seguito è stato quindi quello di valutare se la proteina PII possa avere un ruolo anche nel complesso *pathway* che controlla la formazione, sviluppo e/o funzionamento del nodulo azoto-fissatore.

3.3 Possibile ruolo di PII nella regolazione del movimento stomatico in *L. japonicus*

Come descritto negli ultimi paragrafi dell'introduzione esiste una diretta correlazione fra i prodotti del metabolismo dell'azoto e il processo di

apertura/chiusura delle cellule di guardia. Nelle piante alcune delle vie metaboliche che conducono alla sintesi di segnali cruciali per il controllo del movimento stomatico come l'NO non sono state ancora identificate e molti sono i gruppi di ricerca coinvolti in questo che rappresenta un cosiddetto "*hot topic*" nel campo della biologia vegetale, anche per le fondamentali applicazioni che l'elucidazione di un tale argomento può avere nella messa a punto di strumenti atti a migliorare le capacità di resistenza della piante a condizioni di stress idrico.

Certamente la via biosintetica che conduce alla sintesi di NO a partire da NO_3^- ad opera della nitrato riduttasi prima, e della nitrito riduttasi poi, è una di quelle coinvolte nella sintesi dell'ossido nitrico nei cloroplasti (Fig. 30). Un'altra possibile via di sintesi è quella che coinvolge una NO sintasi di pianta che, a differenza di quanto verificato negli animali, non è stata ancora identificata nelle piante, sebbene diverse evidenze conducano verso l'ipotesi dell'esistenza di un'analogia proteina anche nel regno vegetale (Fig. 40). La tipica reazione della NO sintasi così come è stata caratterizzata nelle cellule animali, catalizza la formazione di NO e citrullina in quantità equimolari a partire da arginina. Per tutto quanto descritto nell'introduzione, è evidente che possono quindi esserci diverse vie metaboliche che coinvolgono alcune delle funzioni finora caratterizzate per la proteina PII di pianta. Un suo possibile coinvolgimento nella sintesi di NO e/o di altri metaboliti come le poliammine che hanno un ruolo cruciale nella regolazione del movimento stomatico può quindi avvenire attraverso diverse vie: i) controllo della biosintesi dell'arginina, ii) controllo della concentrazione di nitrito nel cloroplasto, iii) controllo della biosintesi di poliammine attraverso la via biosintetica dell'arginina.

Uno degli scopi della mia attività sperimentale è stata quindi quello di analizzare con opportuni strumenti di indagine questo possibile coinvolgimento della proteina PII di *L. japonicus* nel movimento delle cellule di guardia in diverse condizioni sperimentali.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Materiale biologico

Gli esperimenti riportati in questo lavoro di dottorato sono stati condotti su piante di *Lotus japonicus* ecotipo GIFU F9 *wild type* (*wt*) o trasformate con i seguenti costrutti ricombinanti: *pCAMBIA-prGLB1:gusA* (*PII-gus*), *pCAMBIA-pr35S-GLB1* (*PII-over*). Il primo costrutto è stato ottenuto fondendo la sequenza regolatrice di 1600 coppie di basi al 5' di *LjGLB1* con il gene *reporter gusA*. Questa sequenza è stata sub-clonata nel vettore di espressione binario, pCAMBIA 1300 dopo aver eliminato la sequenza del promotore 35S. Il secondo costrutto è stato ottenuto mediante un clonaggio della sequenza codificante di 640 bp del gene *LjGLB1* nel vettore pCAMBIA 1300. In questo caso il controllo dell'espressione del gene esogeno è affidato ai segnali del CaMV (*Cauliflower Mosaic Virus*): il promotore P35S ed il terminatore pA35S. Il vettore pCAMBIA utilizzato in questi esperimenti è un vettore binario di 10 kb che viene normalmente utilizzato per consentire l'espressione di sequenze transgeniche in pianta. I costrutti così ottenuti possiedono, al pari di altri vettori binari, le regioni "left border" e "right border", L_B ed R_B , riconosciute dai geni *vir* di agrobatterio, che delimitano la cassetta di espressione, all'interno della quale è anche presente il gene per la resistenza all'igromicina per la selezione in pianta, anch'esso sotto il controllo del promotore costitutivo 35S CaMV. Il gene per la resistenza all'antibiotico kanamicina consente infine la selezione del plasmide nei batteri.

I batteri utilizzati per gli esperimenti di nodulazione sono stati:

- | | | |
|-----------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| - <i>Mesorhizobium loti</i> | ceppo R7A <i>wt</i> | Rif ^R |
| | ceppo R7A <i>nifH</i> | Rif ^R Gent ^R |

4.2 Manipolazione di tessuto vegetale *in vitro*

4.2.1 Sterilizzazione dei semi di *Lotus japonicus*

Prima della germinazione, i semi di *Lotus japonicus*, vengono sterilizzati con una soluzione al 2,5% di ipoclorito di sodio e 0,05% di Triton-X100. I semi sono lasciati in

questa soluzione per 20 minuti in leggera agitazione, quindi sciacquati per 6 volte con acqua sterile sotto cappa a flusso laminare orizzontale e posti a 4°C per una notte. Successivamente i semi vengono posti a germinare su una piastra solida con agar all'1% e mantenuta al buio capovolta per 24 ore a 4°C e per altre 24 ore a 23°C. Queste operazioni preliminari sono necessarie per una parziale sincronizzazione della cinetica di germinazione delle piantine. In seguito le piastre sono poste in verticale in armadi di crescita con temperatura di 23°C e un fotoperiodo con ciclo giorno/notte di 16/8 ore. L'intensità luminosa negli armadi di crescita è di 246 $\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$.

4.2.2 Preparazione terreni di coltura e condizioni di crescita *in vitro*

Mezzo Gamborg's B5 (B5): 3,04g/L di polvere B5 (Duchefa).

Mezzo Gamborg's B5/2: 1,52g/L di polvere B5 (Duchefa).

I mezzi di crescita per le piante sono tamponati utilizzando 0,5 g/L di acido 2,4N-MorpholinoEtansulfossido (MES). Il pH finale di 5,7 è ottenuto aggiungendo KOH. Ai terreni solidi viene aggiunto *plant agar* (Duchefa) in concentrazione 1%.

Antibiotici: per bloccare la crescita batterica di *M. loti* è usato il **cefotaxime** in concentrazione 0,2 mg/ml. Per la selezione delle piantine trasformate è usata l'**igromicina** 5 γ /ml.

4.2.3 Composizione dei mezzi di crescita di base

Gamborg's B5 medium (B5)

Microelementi	Quantità in mg/l	Concentrazione finale
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,11 μM
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,10 μM

NaFeEDTA	36,70	0,10 μM
H ₃ BO ₃	3,00	48,52 μM
KI	0,75	4,52 μM
MnSO ₄ H ₂ O	10,00	56,16 μM
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	1,30 μM
ZnSO ₄ 7H ₂ O	2,00	6,96 μM

Macroelementi	Quantità in mg/l	Concentrazione finale
CaCl ₂	113,23	1,02 mM
KH ₂ PO ₄	2500,00	24,73 mM
KNO ₃	1900,00	18,79 mM
MgSO ₄	121,56	1,01 mM
NH ₄ NO ₃	130,44	1,09 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	134,00	1,01 mM

Vitamine	Quantità in mg/ml	Concentrazione finale
Myo-inositolo	100,00	0,56 mM
Acido nicotinico	1,00	8,12 μM
Piridossina- HCl	1,00	4,86 μM
Tiamina HCl	0,00	29,65 μM

4.2.4 Composizione dei mezzi di crescita con svariate risorse azotate

Per la preparazione di terreni modificati, in cui vi è completa assenza di fonti di azoto, oppure la fonte di azoto è controllata, KNO₃, NH₄NO₃ e (NH₄)₂SO₄ del mezzo B5 di base, non vengono aggiunti e vengono sostituiti con KCl per sopperire alla mancanza di potassio. Il terreno privo di qualsiasi fonte azotata è definito -N. A questo, possono essere aggiunte diverse fonti azotate a diverse concentrazioni per ottenere i mezzi di coltura più disparati. In questa tesi sono stati utilizzati:

- 10 mM NH₄NO₃

- 10 μM NH_4NO_3
- 5 mM KNO_3
- 2,5 mM NaNO_2
- 5 mM NaNO_2
- 10 mM NaNO_2
- 20 mM NaNO_2

4.2.5 Test di sensibilità/resistenza ad igromicina

I semi di *L. japonicus* da testare per il fenotipo di resistenza/sensibilità ad igromicina vengono fatti germinare su piastre contenenti il mezzo di coltura B5/2 con igromicina 5 γ /ml. Come controllo negativo vengono utilizzate piantine *wild type*. Dopo 2-3 settimane compare il fenotipo di sensibilità che corrisponde a piantine con un elevato accumulo di antocianine, uno *shoot* non sviluppato e la radichetta molto corta.

4.2.6 Procedura di nodulazione *in vitro*

La messa a punto di condizioni *in vitro* riproducibili, sono essenziali per lo studio dei diversi momenti del processo simbiotico tra la pianta leguminosa *L. japonicus* ed il batterio *Mesorhizobium loti*. È importante che ogni singolo meristema radicale venga in contatto con lo stesso numero di batteri.

■ Preparazione dei batteri

Una singola colonia di *Mesorhizobium loti* ceppo R7A, viene fatta crescere per 16 ore a 30°C nel mezzo TYR contenente 6mM di CaCl_2 e 100 μM di antibiotico Rifampicina. I batteri cresciuti, vengono centrifugati a 4500 giri per 10 minuti, il pellet ottenuto viene lavato con una soluzione di PBS 1X e una volta ricentrifugato, viene risospeso in 1ml di PBS 1X. Dopo aver effettuato la lettura allo spettrofotometro della coltura batterica ($A_{600\text{nm}}$), si possono fare le opportune diluizioni della coltura in modo da ottenere la concentrazione batterica ottimale per l'infezione delle piante.

▪ Infezione delle piante con *M. loti*

Una volta ottenuto un sistema radicale di dimensioni ottimali, con radici di almeno 1 cm di lunghezza, le piante, posizionate su un filtro e su una piastra contenente un mezzo di coltura che consenta la nodulazione, vengono inoculate con 20 μ l di sospensione batterica contenenti circa 10^7 cellule per ogni zona meristemica radicale. È importante che la sospensione batterica venga diffusa lungo tutta la lunghezza della regione competente. La carta da filtro è importante per ottenere una completa e uniforme diffusione dei batteri sul meristema radicale, ma viene rimossa quattro giorni dopo l'infezione. Le radici infettate vengono tenute al buio per le successive 4 settimane dall'infezione ed il numero di noduli è analizzato allo stereoscopio.

4.3 Saggio istochimico della β -glucuronidasi

Il gene *gusA*, isolato da *E. coli*, codifica per una proteina, la β -glucuronidasi, in grado di idrolizzare i legami β -glicosidici. L'espressione del gene *gusA* può essere rivelata valutando l'attività enzimatica della β -glucuronidasi con un saggio istochimico. In presenza di un substrato artificiale, quale l'X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indol- β -glucuronide), la reazione di idrolisi proteica produce, attraverso un intermedio instabile, un precipitato blu insolubile, il dicloro-dibromo indingo, che immediatamente precipita. Questo permette di capire se le piante trasformate con un vettore contenente questo gene *reporter* sono transgeniche (GUS+) o non transgeniche (GUS-). Un'altra applicazione è quella di ottenere studi sulla localizzazione spaziale dell'attività promotrice di un certo gene di interesse, fondendo la regione promotrice del gene con la sequenza codificante del gene *gusA* ed analizzando le piante trasformate con questo costrutto mediante saggio GUS. Altri vantaggi del sistema sono la velocità del saggio, la mancanza di un'attività endogena dell'enzima, quindi un basso rumore di fondo, e la notevole sensibilità.

La colorazione GUS è fatta immergendo il materiale in una soluzione 0,1 M del tampone Na_3PO_4 (pH 7,2), 0.1% di Triton 100x per permeabilizzare i tessuti e 1 mM di X-gluc. Il campione viene lasciato per 10 minuti sotto vuoto per facilitare l'ingresso del substrato e poi a 37°C al buio per il tempo necessario allo sviluppo della colorazione. I campioni possono quindi essere analizzati.

4.4 Estrazione della clorofilla dal tessuto vegetale

Per una migliore visualizzazione della colorazione nelle foglie, queste sono state lavate con tampone Na_3PO_4 50 mM ed allontanate le clorofilla con etanolo 70%, cambiando più volte la soluzione. Lavate nuovamente con tampone fosfato, le foglie sono state analizzate al microscopio ottico.

4.5 Preparazione delle sezioni di radice e di nodulo al vibratomo ed osservazione al microscopio ottico

I frammenti di radice (di circa 3 mm) contenenti o meno i noduli vengono sottoposti ad inclusione in agarosio al 6%. Completata la solidificazione dell'agarosio, si prepara un "blocchetto" a forma di piramide tronca a base quadrata, con al centro il frammento di interesse (radice o nodulo), che viene utilizzata per ottenere le sezioni di 55-60 μm di spessore al vibratomo Leica VT 1000S. Velocità di movimento della lama: 2; frequenza di vibrazione della lama: 3. Le sottili lamine di agarosio contenenti le sezioni di radice o nodulo vengono messe in tampone fosfato 50 mM ed analizzate prima allo Stereomicroscopio Leica MZ16FA e poi al microscopio Dritto Leica DM6000. Gli obiettivi utilizzati sono:

- 5x Hcx PL Fluotar NA 0,15
- 10x Hcx PL Fluotar NA 0,3
- 20x Hcx PL Fluotar NA 0,5
- 40x Hcx PL Anapo NA 0,75
- 100x Hcx PL ApoCS NA 1,4 immersione ad olio

4.6 Trasferimento *vitro-vivo* delle piante di *L. japonicus*

Quando le piantine cresciute *in vitro* hanno un apparato radicale ben sviluppato (dopo 4-5 settimane dalla germinazione), sono pronte per essere trasferite in terreno. Il terreno viene preparato utilizzando una parte di sabbia, una parte di torba e due parti di terriccio e viene sterilizzato in autoclave. Le piantine vengono trasferite immergendo delicatamente l'apparato radicale in terreno e ricoprendo il vaso con la pellicola trasparente umida. Questa operazione è necessaria per creare un ambiente protetto simile ad una piccola serra in modo da garantire un periodo di acclimatazione delle piante alle nuove condizioni. Trascorsa una settimana, la pellicola viene rimossa e le piante vengono innaffiate regolarmente ogni due giorni. La crescita delle piante avviene in una camera con temperatura di 23°C e un fotoperiodo con ciclo giorno/notte di 16/8 ore e con intensità luminosa pari a 246 $\mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$.

4.7 Raccolta e conservazione dei baccelli e dei semi di *L. japonicus*

I baccelli maturi vengono raccolti e lasciati per una settimana a 30°C; i baccelli resi così ben secchi vengono aperti ed i semi ottenuti vengono conservati a 4°C al buio.

4.8 Estrazione di acidi nucleici da pianta

4.8.1 Estrazione del DNA da tessuto vegetale

Circa 0,2 grammi di tessuto vegetale viene congelato a -80°C rapidamente. Prima di omogeneizzare i campioni in modo meccanico mediante *tissue lyser* (QIAGEN) ad ogni eppendorf vengono aggiunti 0,5 ml di una soluzione contenente Tris-HCl 50 mM (pH 8), EDTA 10 mM (pH 8), NaCl 100 mM, sarcosyl 1% e Urea 10 mM. La miscela ottenuta viene incubata a 37°C per un'ora, in costante agitazione. A questo punto si effettua un'estrazione con fenolo:cloroformio:alcool isoamilico (24:24:1) mantenendo nuovamente i campioni un'ora a 37°C in costante agitazione. I campioni vengono centrifugati a 7000xg per 5 minuti e il surnatante si recupera. Il DNA viene

fatto precipitare con l'aggiunta di un volume di isopropanolo e sodio acetato in concentrazione finale 0.3 M. In seguito a centrifugazione a 7000xg per 5 minuti il DNA ottenuto viene lavato con etanolo 70%, asciugato e risospeso in TE con l'aggiunta di RNAsi A (1µg/ml).

4.8.2 Estrazione dell'RNA da tessuto vegetale

I tessuti prelevati (circa 0,2- 0,3 g) dalla pianta di *L. japonicus* vengono immediatamente congelati a -80°C. Ai campioni congelati vengono aggiunti 550 µl di una soluzione di lisi contenente: 2% CTAB, 2% polyvinylpirrolydone (MW 360.000), 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25mM EDTA, 2M NaCl, 0,05% DEPC a cui viene aggiunto poco prima dell'uso β-mercaptoetanolo al 2% finale. I campioni vengono quindi omogeneizzati meccanicamente mediante *tissue lyser* (QIAGEN). Seguono due estrazioni con fenolo:cloroformio:alcool isoamilico (24:24:1). L'RNA contenuto nel surnatante, viene precipitato con l'aggiunta di un volume di isopropanolo, per 10 minuti a temperatura ambiente. Dopo una centrifugazione di 20 minuti a 14.000 rpm, il *pellet* ottenuto, viene lavato con etanolo 70%, asciugato e risospeso in acqua con l'aggiunta di DEPC 0,005%.

4.9 Migrazione elettroforetica su gel di agarosio di acidi nucleici

L'elettroforesi permette la separazione di frammenti degli acidi nucleici in base al loro peso molecolare. Per la migrazione elettroforetica dell'RNA e dei prodotti di PCR di piccole dimensioni si utilizzano gel d'agarosio all'1,5%; per frammenti di DNA di maggiori dimensioni si utilizzano concentrazioni più basse in modo da permettere una maggiore risoluzione delle bande a più alto peso molecolare. Il gel d'agarosio viene preparato solubilizzando a caldo l'agarosio in polvere in un tampone TAE (Tris acetato EDTA) 1X; poco prima di versare il gel nel lettino elettroforetico viene aggiunto l'agente intercalante bromuro di etidio alla

concentrazione di 0.33 µg/ml. La corsa elettroforetica è condotta a temperatura ambiente ad un voltaggio costante di circa 10 Volt/cm, usando TAE 1X come tampone di corsa. I campioni da analizzare vengono diluiti in una soluzione di TAE 1X, 0,25% xilene cianolo, 0,25% blu di bromofenolo e 0,5% di glicerolo. Per l'analisi dei prodotti delle reazioni di PCR vengono utilizzati marcatori di peso molecolare 1Kb DNA ladder e/o 100 bp DNA ladder.

4.10 Conversione dell'RNA in cDNA

Per questa procedura si utilizza il kit "*QuantiTect Reverse Transcription*" della QIAGEN. Questo kit prevede due fasi: in una prima fase si esegue un trattamento con DNAsi per rimuovere eventuali contaminazioni da DNA dagli RNA preparati, incubazione per 4 minuti a 42°C nella macchina per PCR. Quindi si aggiungono i *primer* (50 µM concentrazione finale), la miscela di dNTP (2,5 mM concentrazione finale ognuno), il *buffer* e la trascrittasi inversa. La reazione di retro-trascrizione avviene a 42°C per 30' a cui seguono 3' a 95°C per inattivare l'enzima.

4.11 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

La PCR è una tecnica che permette l'amplificazione selettiva di una regione di DNA, usando due oligonucleotidi (*primer*) complementari alle regioni immediatamente adiacenti alle regioni di DNA d'interesse. Il DNA d'interesse circa 100 ng è risospeso in una soluzione 2,5 mM MgCl₂, tampone 1X (la soluzione di partenza è 10X e contiene 500 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9 e 1 % triton 100X) e 0,2 mM dNTP. Alla miscela viene aggiunta la giusta coppia di oligonucleotidi di circa 20 bp ad una concentrazione di 30 mM. Una reazione di PCR standard è composta secondo questo schema riportato in Tab.1:

Tabella 1 - Programma di amplificazione di una PCR standard

Fase	Temperatura (°C)	Tempo
Denaturazione	94	5'
Denaturazione	94	30''
<i>Annealing</i>	60	30''
Polimerizzazione	72	40''
Polimerizzazione	72	5'

} × 35 cicli

Lo schema standard subisce delle variazioni in base alla temperatura di appaiamento (temperatura di *annealing*) degli oligonucleotidi necessari per l'avvio della polimerizzazione ed in base alla lunghezza del frammento che bisogna amplificare. Il tempo della fase di polimerizzazione può essere di 30'' per frammenti di 500 bp e si aggiungono altri 30'' per ogni 500 bp in più nella lunghezza dell'amplicone. L'enzima in grado di catalizzare questa reazione è la Taq polimerasi che è termostabile.

4.12 PCR semi-quantitativa (qRT-PCR) utilizzando come stampo il cDNA

L'amplificazione mediante PCR può essere utilizzata come metodo sensibile per fare quantizzazioni di trascritti ed analisi dell'espressione genica. Il cDNA è il substrato di questa comune reazione di PCR. Mediante questa tecnologia si possono analizzare le variazioni nell'espressione di un determinato gene in funzione di svariati parametri ambientali, temporali e spaziali. La quantizzazione può essere assoluta o relativa. La quantizzazione assoluta richiede la costruzione di una curva di calibrazione in base all'uso di standard le cui concentrazioni sono note. La quantizzazione relativa si basa sull'incremento o diminuzione del prodotto del gene d'interesse rispetto ad uno standard interno. Come standard bisogna scegliere un gene che è espresso costitutivamente che non subisce variazioni di espressione con il variare delle condizioni che si devono analizzare. L'analisi di espressione dello standard e del gene d'interesse nel campione che deve essere analizzato permette di effettuare il confronto e quindi la quantizzazione. Lo standard interno comunemente utilizzato per i nostri esperimenti è il gene dell'ubiquitina. La sequenza dei *primer*

utilizzati nelle diverse analisi di qRT-PCR sono riportati nella tabella 2; in questa tabella sono indicate anche la temperatura di fusione di ciascun *primer* (T_m) e le dimensioni in coppie di basi del prodotto di amplificazione per ciascuna coppia; nella tabella 3 sono invece riportati i programmi di PCR utilizzati per l'amplificazione dell'ubiquitina e di *LjGLB1*.

Tabella 2 - Oligonucleotidi utilizzati nella reazioni di qRT-PCR

Nome	Sequenza	T_m (°C)	bp
LjUbi-FWD	5'-TTC ACC TTG TGC TCC GTC TTC-3'	64	90
LjUbi-REV	5'-AAC AAC AGC ACA CAC AGA CAA TCC-3'	70	
PIIprFor	5'-TGG AAG CAA TTC TCA GGC CC-3'	62	311
PIIprRev	5'-GCT CAC CTG TGC GAA CTC TT-3'	62	
upDrought-F	5'-TTC TGC CAC CAG GAA AAA TC-3'	55	166
upDrought-R	5'-ATG AGC TCC ACG TGC TTC TT-3'	57	
downDrought-F	5'-TGC TCA CGC CAC TTT CTA TG-3'	57	154
downDrought-R	5'-ATAGCA AGA CCC GCA GCT TA-3'	57	

Tabella 3 - Programmi di amplificazione delle PCR per i geni ubiquitina, *LjGLB1* e il gene *up-regolato* e quello *down-regolato* in condizioni di siccità (*drought*)

	<i>Ubiquitina</i>		<i>LjGLB1</i>		<i>Drought</i>	
Fase	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo
Denaturazione	94	3'	94	3'	94	3'
Denaturazione	94	30''	94	30''	94	30''
Annealing	23 { 63	30''	28 { 59	30''	28 { 54	30''
Polimerizzazione	72	30''	72	40''	72	40''
Polimerizzazione	72	5'	72	5'	72	5'

4.13 Preparazione degli epidermidi fogliari ed analisi del grado di apertura stomatica nelle foglie di *L. japonicus*

Le foglie giovani sono state raccolte da piante di *L. japonicus* di circa 2 mesi e gli epidermidi fogliari si preparano con la metodica descritta da Perfus-Barbeoch *et al.* 2002 modificata per le piante di *L. japonicus* in cui il mesofillo fogliare risulta particolarmente adeso all'epidermide. La pagina inferiore (abassiale) delle pellicole fogliari viene incollata su un vetrino coprioggetti con una particolare colla al silicone (Telesis™ silicone adhesive), che non impedisce i movimenti stomatici. Dopo il *peeling*, i vetrini vengono immersi in una piastra *Petri* con il seguente tampone:

- MES 10 mM
- KCl 30 mM
- pH 6.0

Il grado di apertura stomatica si misura al microscopio ottico (Nikon Optiphot-2) dotato di una camera lucida ed una lavagnetta digitale, tutto collegato ad un computer. Per ogni trattamento vengono misurate le aperture stomatiche di circa 70 stomi in meno di 5 minuti. Ogni punto corrisponde alla media di queste 70 aperture stomatiche e ciascun esperimento viene effettuato con almeno tre replicati biologici.

4.14 Analisi del tasso di traspirazione

Porzioni apicali di steli con 4-5 internodi vengono prelevati dalle piante su cui effettuare l'analisi del tasso di traspirazione ed incollati in posizione verticale su un supporto solido assicurandosi che il sito di ferita sia ben suturato dalla colla. Le porzioni di pianta così preparate vengono mantenute al buio per 3 ore valutando il peso alla bilancia analitica ogni 10 minuti. La riduzione di peso è correlata alla quantità di acqua persa per traspirazione.

4.15 Analisi di valutazione del *Ratio Water Content* (RWC)

Per questa analisi, le piante vengono cresciute *in vivo* sottoponendole a condizioni di stress idrico interrompendo l'aggiunta di acqua. Come controllo viene usata sempre una pianta regolarmente innaffiata. A diversi intervalli di tempo, si prelevano delle porzioni di stelo, dopo 3, 5, 7, 9 giorni dall'interruzione della distribuzione d'acqua e si valuta per ogni punto temporale il peso fresco, il peso al massimo turgore ed il peso secco alla bilancia analitica. Il peso fresco viene misurato al momento del prelievo, la porzione di stelo viene quindi incubata in una piastra *Petri* contenente acqua per due giorni, momento in cui si misura il peso al massimo turgore. Gli espianti vegetali vengono quindi messi in stufa a 80°C per poter misurare il peso secco. Per la valutazione del *Ratio water content* (RWC) si applica la seguente formula:

$$\text{RWC (\%)} = \left[\frac{(W - DW)}{(TW - DW)} \right] \times 100$$

Dove:

TW = peso in piena turgidità del tessuto

DW = peso secco

W (o FW)= peso fresco

4.16 Preparazione degli estratti vegetali per la misurazione dei livelli di poliammine mediante HPLC

Questa procedura è stata effettuata secondo il protocollo riportato in Liu *et al.* 2000, partendo da 1g di tessuto fresco fogliare e 0,1-0,5g di radici o noduli di piante di *L. japonicus* cresciute in terreno o *in vitro*.

4.17 Preparazione degli estratti proteici e valutazione della concentrazione proteica mediante il metodo di Bradford

Per la preparazione degli estratti proteici vengono utilizzati 0,6 g di foglie per ciascun campione da analizzare; le foglie vengono omogeneizzate in modo meccanico con l'impiego del *tissue lyser* dopo aver aggiunto un tampone di estrazione (6 ml/g peso fresco) con la seguente composizione:

- 100 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 10 μ M FAD
- 1 mM EDTA
- 0,1%(v/v) Triton X-100
- 1 mM DTT
- 1 mM PMSF

Per determinare la concentrazione proteica possono essere utilizzati diversi metodi. I metodi colorimetrici sono molto utilizzati e permettono di determinare la concentrazione proteica non solo di una singola proteina pura, ma anche di miscele proteiche, attraverso comparazione con una curva (o retta) di taratura (o di riferimento). Il più diffuso metodo colorimetrico è il metodo di Bradford in cui il colorante Blu di Coomassie forma composti colorati in blu con le proteine, tramite legami elettrostatici proteina-gruppi sulfonici del colorante in soluzione acida. Normalmente il blu di coomasie è rosso e diventa blu solo quanto è legato a proteine; l'intensità della colorazione è indice della concentrazione proteica. La retta di taratura è disegnata con la proteina nota BSA (albumina di siero bovino), una proteina comune, poco costosa e facilmente reperibile, di cui si utilizzano quantità note crescenti. La retta di taratura riporta sull'asse delle ascisse la quantità crescente in μ g di BSA e sull'asse delle ordinate i valori di OD (*optical density*) riferiti ai valori di assorbanza a 595 nm ottenuti con la lettura allo spettrofotometro della BSA. Leggendo l'assorbanza a 595 nm dell'estratto proteico in esame, si può risalire alla quantità di proteine presenti, identificando il valore dell'assorbanza sull'asse delle ordinate e proiettandolo sulla retta e poi sull'asse delle ascisse. Da questo si ottiene il valore di concentrazione dell'estratto iniziale dividendo tale valore per il volume

utilizzato durante la lettura dell'assorbanza e moltiplicandolo per il fattore di diluizione.

4.18 Saggio della nitrato reduttasi

Come detto nell'introduzione, la nitrato reduttasi (NR) catalizza la reazione di riduzione del nitrato a nitrito:



La determinazione dell'attività nitrato riduttasica viene compiuta determinando la presenza di nitrito prodotto, nella reazione che usa il NADH come donatore di elettroni ed il nitrato di sodio come substrato. La miscela di incubazione per far avvenire questa reazione *in vitro* è la seguente [Marquez *et al.* 2005]:

- | | |
|----------------------------------|---|
| ▪ Tampone fosfato (pH 7,5) 0,3 M | 0,3 ml |
| ▪ Nitrato di sodio 0,2 M | 0,1 ml |
| ▪ NADH 2 mM | 0,2 ml |
| ▪ Estratto proteico | 0,5 ml |
| ▪ Acqua MilliQ | fino a 2 ml di volume finale del saggio |

Nel campione al T₀ (Tempo zero) non va aggiunto il NADH. I diversi tempi della reazione possono cambiare a seconda delle circostanze; in genere la massima attività osservata è al T_{20'} (dopo 20' dall'inizio del saggio). Le reazioni vengono bloccate aggiungendo 1 ml di bario acetato 150 mM refrigerato ed 1 ml di etanolo 95% per far precipitare le proteine ed il NADH eventualmente non reagito. Infatti, il NADH potrebbe, se non rimosso, interferire con il reattivo dei nitriti, riducendolo. I campioni vengono quindi centrifugati a 4000xg per 5 minuti, per chiarificare la soluzione. Ad ogni reazione viene quindi aggiunto il reattivo dei nitriti costituito da:

1. Sulfanilammide 1g/100 ml HCl 25%
2. N-(1-naftil)-etilen-diamina cloridrato 80 mg/100 ml acqua

Il reattivo per i nitriti si ottiene mescolando due parti della soluzione 1 con una parte della soluzione 2. Dopo 10 minuti dall'aggiunta di questo reattivo, si determina l'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 540 nm allo spettrofotometro utilizzando come bianco il campione al T₀.

Per valutare l'attività enzimatica dell'estratto proteico si utilizza la formula seguente:

$$\text{mU/ml} = \frac{\text{A}_{540} \text{ net} \cdot 1,5}{V \text{ (ml)} \cdot t \text{ (min)} \cdot 0,046}$$

In cui:

A₅₄₀ net: differenza di assorbanza del campione meno il bianco (T₀)

V (ml): volume dell'estratto usato per il saggio

t (min): tempo del saggio

0,046: coefficiente di estinzione molare ($\epsilon_{540} = 46 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

5. RISULTATI

5.1 Ottenimento delle piante omozigoti trasformate con *pCAMBIA-prGLB1:gusA* o *pCAMBIA-pr35S-GLB1*

Come descritto nel capitolo dei “Materiali e Metodi”, gli esperimenti riportati in questo lavoro di dottorato sono stati condotti su piante di *Lotus japonicus* ecotipo GIFU F9 *wild type* (*wt*) o trasformate con i seguenti costrutti ricombinanti: *pCAMBIA-prGLB1:gusA* (*Pll-gus*), *pCAMBIA-pr35S-GLB1* (*Pll-over*). Queste piante transgeniche erano state ottenute mediante la metodica di trasformazione messa a punto in *L. japonicus* e mediata da *A. tumefaciens* [Lombardi *et al.* 2003; Barbulova *et al.* 2005]. Il vettore binario *pCAMBIA1300* utilizzato porta all’interno delle sequenze “*left border*” e “*right border*”, *L_B* ed *R_B* che delimitano il frammento di DNA trasferito nel genoma della pianta trasformata, oltre alle cassette per l’espressione della fusione *gusA* o della proteina PII, il gene per la resistenza all’igromicina per la selezione in pianta, anch’esso sotto il controllo del promotore costitutivo 35S CaMV. Poiché il processo di trasformazione non è un processo efficiente al 100% e poiché il T-DNA viene integrato in emizigosi al momento della trasformazione e segrega attraverso le linee germinali nelle successive generazioni, è indispensabile fornirsi di uno strumento in grado di discriminare le piante trasformate. A questo scopo vengono impiegati i geni marcatori ed i geni *reporter*. I primi sono geni che conferiscono un vantaggio selettivo alle cellule transgeniche in modo che esse possano crescere in condizioni non vitali per le analoghe cellule non transgeniche (geni di resistenza ad antibiotici, ad erbicidi, ecc.). I secondi sono geni che non conferiscono un vantaggio selettivo, ma un particolare fenotipo alle cellule transgeniche in modo che esse possano essere evidenziate tra le analoghe cellule non transgeniche (gene *gusA*, *gfp*, ecc.).

La prima parte del progetto è stata quindi rivolta all’ottenimento di piante omozigoti di *Lotus japonicus* che esprimessero il costrutto di fusione *prGLB1:gusA* o *over*-esprimessero il gene *GLB1* sotto il controllo del promotore costitutivo p35S del CaMV che rappresentavano lo strumento da utilizzare per le successive caratterizzazioni fenotipiche. Il test di resistenza/sensibilità all’antibiotico igromicina è stato quindi utilizzato per discriminare le piante resistenti, trasformate con il costrutto di

interesse, e le piante sensibili, non trasformate. I semi di *L. japonicus* da testare per il fenotipo di resistenza/sensibilità ad igromicina sono stati fatti germinare su piastre contenenti il mezzo di coltura B5/2 con igromicina 5 μ /ml. Come controllo negativo sono state utilizzate piantine *wild type*. Dopo 2-3 settimane di questo trattamento compare un chiaro fenotipo di sensibilità che corrisponde a piantine con un elevato accumulo di antocianine, uno *shoot* non sviluppato e la radichetta molto corta (Fig. 45).

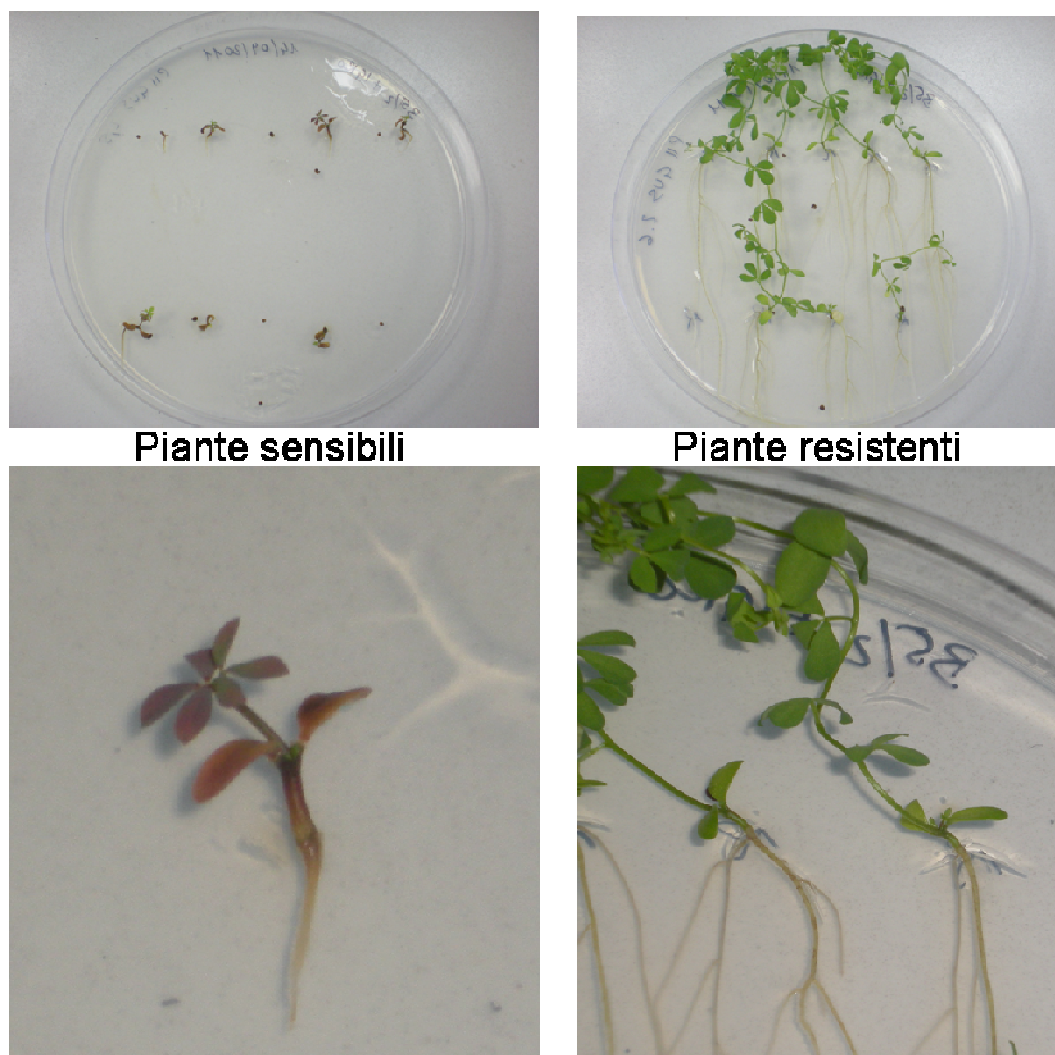


Figura 45: Test di resistenza/sensibilità all'antibiotico igromicina. A sinistra è rappresentato il classico fenotipo di sensibilità a questo antibiotico, mentre a destra il fenotipo di resistenza, corrispondente a piante con crescita e sviluppo normali.

Semi T₁ delle linee trasformanti indipendenti *P11-over A*, 5 e 7 (Tab. 4) e *prGLB1-gusA* 1, 2, 3, 4 e 5 (dati non mostrati) sono state sottoposte ad un test sensibilità/resistenza ad igromicina; le piantine resistenti sono quindi state trasferite in terreno e portate a

fiore per raccogliere i semi della generazione T_2 da singole piante segreganti su cui è stato effettuato un altro test di sensibilità/resistenza all'igromicina. Purtroppo normalmente nella fase di trasferimento dalle condizioni *in vitro* a quelle *in vivo*, le piante sono soggette ad un forte stress che spesso ne determina la perdita. Per questo motivo, le piante segreganti T_2 analizzate sono state solo 2 per la linea trasformante A e 3 per quella 7 (Tab. 4). Il test di sensibilità/resistenza all'igromicina sulla generazione T_2 è stato, laddove possibile, effettuato con un numero elevato di semi che consentisse di verificare un'eventuale assenza del fenotipo di sensibilità, e quindi di segregazione mendeliana del carattere igromicina resistenza, statisticamente significativa. In questo modo, nella generazione T_2 è stato possibile identificare due segreganti omozigoti della linea trasformante 7 (7.7 e 7.10 in Tab. 4) mentre ciò non è stato possibile con la linea A. Quindi, 8 piantine T_2 segreganti indipendenti della linea A resistenti all'igromicina sono state trasferite *in vivo* e portate a fiore per raccogliere i semi della generazione T_3 da singole piante ed effettuare un ulteriore test di sensibilità/resistenza all'igromicina ed identificare dei segreganti omozigoti (A9.2 e A.9.6 in Tab. 4).

Generazione	Linea	N° pt tot	N° pt R	N° pt S
T_1	PII-over A	12	9	3
	PII-over 5	27	18	9
	PII-over 7	22	15	7
T_2	PII-over A.9	18	15	3
	PII-over A.11	28	18	10
	PII-over 7.7	23	23	0
	PII-over 7.10	28	28	0
	PII-over 7.14	27	14	13
T_3	PII-over A.9.1	14	11	3
	PII-over A.9.2	14	14	0
	PII-over A.9.5	13	8	5
	PII-over A.9.6	20	20	0
	PII-over A.9.9	11	8	3
	PII-over A.9.10	20	18	2
	PII-over A.9.13	20	12	8
	PII-over A.9.15	19	13	6

Tabella 4: Analisi del test di sensibilità/resistenza all'igromicina per l'ottenimento dei segreganti omozigoti per l'*over*-espressione del gene *GLB1* di *L. japonicus*. R: resistente; S: sensibile.

I segreganti *PII-over* 7.7, *PII-over* 7.10, *PII-over* A.9.2 e *PII-over* A.9.6 sono stati quindi utilizzati per ulteriori analisi fenotipiche. Naturalmente l'analisi effettuata non esclude la presenza di un numero di copie del T-DNA maggiore di 1 che potrebbe essere verificata solo mediante un'analisi per *Southern blot* che non è stata comunque effettuata.

5.2 Analisi di qRT-PCR delle piante segreganti omozigoti ottenute

Sui diversi segreganti omozigoti ottenuti, sono stati effettuati esperimenti di RT-PCR semiquantitativa, per valutare il livello di trascritto del gene *GLB1* in queste piante (Fig. 46).

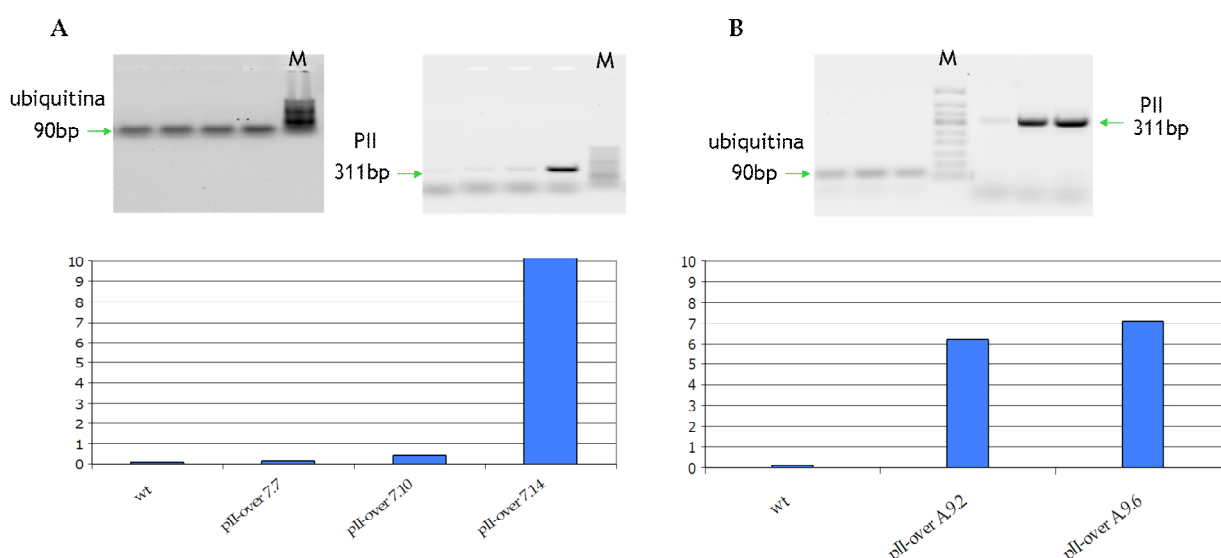


Figura 46: Analisi semiqRT-PCR del gene *GLB1* in piante *wt* (controllo) e segreganti della generazione T_2 delle linee trasformanti 7 e A. (A) Sono analizzati i segreganti *PII-over* 7.7, 7.10 e 7.14. (B) Sono analizzati i segreganti *PII-over* A.9.2 e A.9.6. Come *standard* interno è stato usato il gene dell'ubiquitina.

I risultati ottenuti con la linea trasformante 7, sono stati in alcuni casi in contraddizione con l'analisi fenotipica di resistenza/sensibilità descritte nella Tab. 4. Infatti, come si può osservare in Figura 46, i segreganti *PII-over* 7.7 e 7.10, risultati omozigoti al test di sensibilità/resistenza all'igromicina, non *over-esprimevano* il gene di interesse *GLB1*, a differenza del segregante *PII-over* 7.14, in cui l'*over-espressione* osservata era di circa 10 volte (Fig. 46). Questo fenomeno potrebbe essere

associato ad una segregazione indipendente di diverse copie del T-DNA, che solo in uno o in alcuni casi consentono un alto livello di attività del promotore 35S e quindi di espressione del gene *GLB1*. Questo fenomeno è definito in genetica molecolare come “*position effect*” ed è legato alle conformazioni eu e/o eterocromatiche dei *loci* di integrazione. Un'altra possibilità è legata al fenomeno del silenziamento genico che può anche essere associato a integrazioni multiple del T-DNA (soppressione genica). Per questo motivo, abbiamo deciso di focalizzare la nostra attenzione sulla pianta 7.14, il cui livello di espressione è stato però controllato anche nella successiva generazione (T_3). L'analisi per semiqRT-PCR sulla successiva generazione, ha in effetti confermato un alto livello di espressione in tutti i segreganti T_3 analizzati (Fig. 47) e quindi si è deciso di usare le piante T_3 e T_4 derivate dalla 7.14 per le successive caratterizzazioni fenotipiche, verificando sempre il livello di espressione delle piante utilizzate. Per quanto riguarda la linea trasformante A invece, l'analisi di espressione non ha rilevato alcuna incongruenza e le piante omozigoti identificate A9.2 e A9.6 hanno sempre mostrato un significativo livello di *over*-espressione del gene *GLB1* (6 e 7 volte, rispettivamente in Fig. 45B). La pianta A9.6 (e le successive generazioni T_3 e T_4) è stata quindi scelta per le successive caratterizzazioni fenotipiche ed anche in questo caso l'*over*-espressione è stata sempre confermata nelle piante utilizzate per la caratterizzazione fenotipica. La sequenza dei *primer* utilizzati nelle diverse analisi di semiqRT-PCR, la loro temperatura di fusione (T_m), le dimensioni in coppie di basi del prodotto di amplificazione per ciascuna coppia ed i programmi di amplificazione utilizzati per l'ubiquitina e *LjGLB1*, sono riportati nel capitolo dei “Materiale e Metodi”.

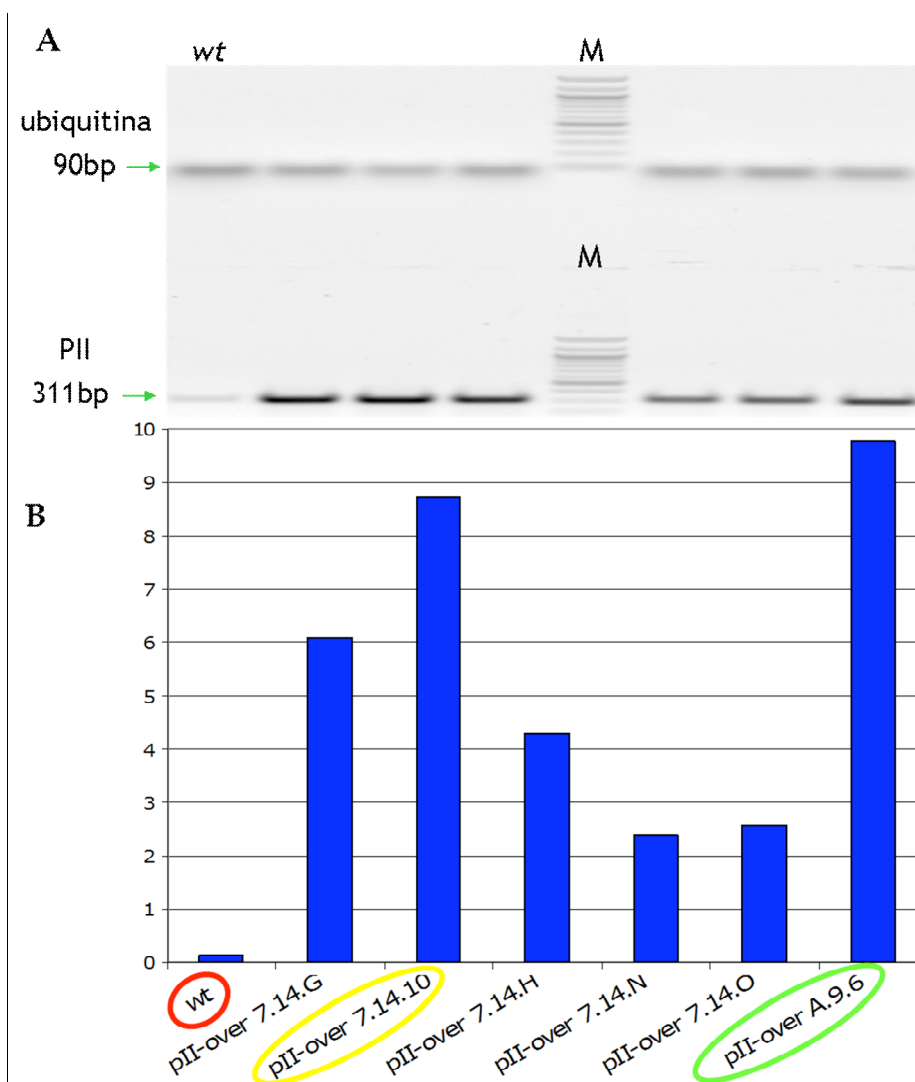


Figura 47: Analisi qRT-PCR del gene *GLB1* in piante *wt* (controllo) e diversi segreganti della generazione T₃. Sono analizzati i segreganti *pII-over* 7.14.G, 7.14.10, 7.14.H, 7.14.N, 7.14.O. Come controllo positivo è stato usato il segregante omozigote ed *over-esprimente* *pII-over* A.9.6. Come standard interno ho utilizzato il gene dell'ubiquitina.

5.3 Analisi del profilo spaziale di attività del promotore del gene *LjGLB1*

L'analisi al microscopio ottico dritto dell'attività GUS delle piante di *L. japonicus* trasformate con il costrutto di fusione *prGLB1-gusA* ha dimostrato, in accordo con quanto osservato in esperimenti di RT-PCR precedenti al mio lavoro di Dottorato, e miranti a definire il profilo di trascrizione di questo gene, un'espressione ubiquitaria in tutti gli organi analizzati. In particolare, l'attività GUS è stata evidenziata nella radice (cilindro vascolare e *cap* della radice primaria e secondaria) (Fig. 48A), nel nodulo (strutture vascolari e *inner cortex*) (Fig. 48C), e nelle foglie (Fig. 48D). Inoltre,

sezioni trasversali di 55-60 μm di spessore della radice, ottenute al vibratomo, hanno evidenziato maggiori dettagli di tale localizzazione indicando un'attività promotrice soprattutto a livello del cilindro vascolare, nei vasi xilematici e floematici (Fig. 48B).

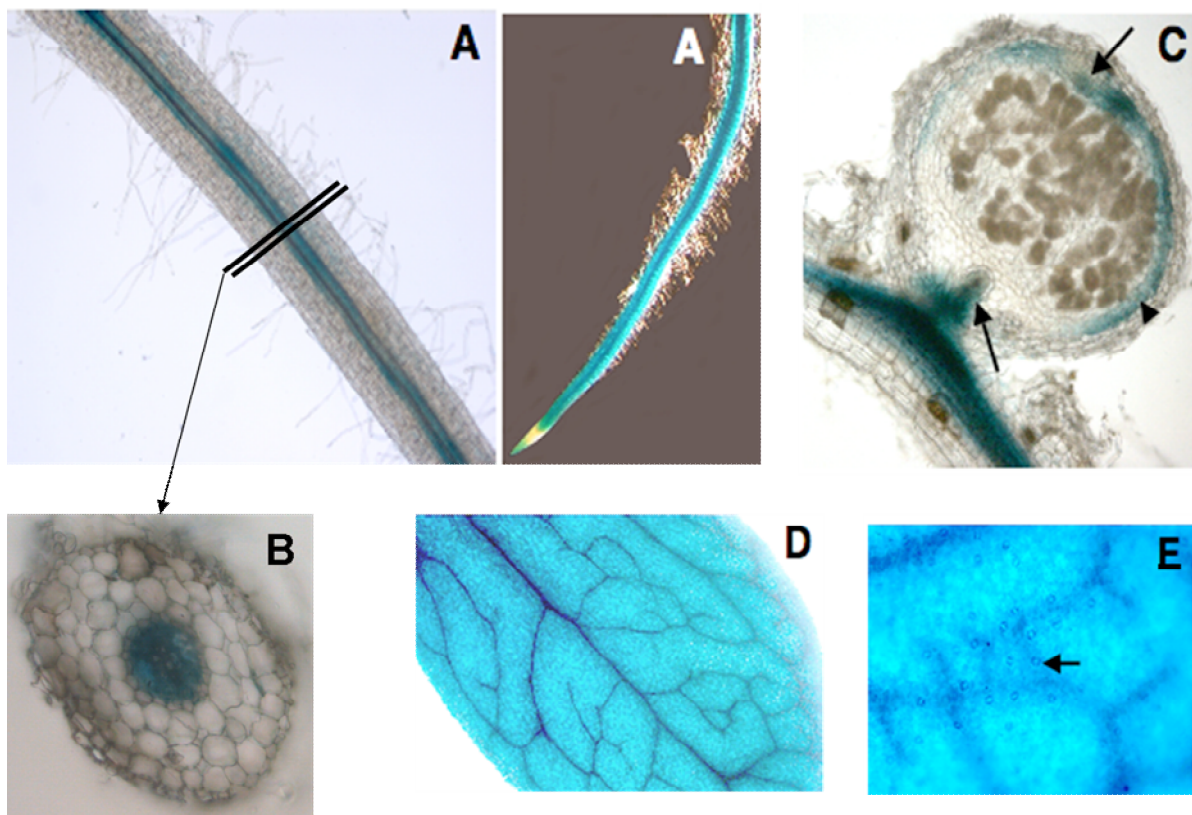


Figura 48: Analisi del profilo di espressione della fusione *prGLB1-gusA* in piante di *L. japonicus*. (A) Radici. (B) Sezione trasversale di 55-60 μm di spessore della radice. (C) Sezione longitudinale di 55-60 μm di spessore del nodulo azoto-fissatore maturo. (D-E) Espressione di *gusA* nel sistema di trasporto primario e secondario delle foglie e del mesofillo. La freccia indica uno stoma.

Anche l'espressione di *gusA* nelle foglie è stata analizzata in maggior dettaglio. L'attività GUS è stata riscontrata a livello del sistema di trasporto primario e secondario, oltre che nelle cellule del mesofillo ed in particolare a livello delle cellule di guardia delle aperture stomatiche (Fig. 48D-E). Foto molto dettagliate degli stomi sono state ottenute con una tecnica di *peeling* che ho appreso nei laboratori del Prof. Alain Vavasseur del *Laboratoire des Echanges Membranaires et Signalisation*, all'*Institut de Biologie Végétale et Microbiologie Environnementales* del CNRS/CEA/Université di Marsiglia. Questa metodologia consente la rimozione del mesofillo fogliare, che in *L. japonicus* risulta particolarmente adeso all'epidermide. L'attività GUS è rilevata all'interno delle cellule del mesofillo e delle cellule di guardia degli stomi, mentre è del tutto assente nelle cellule dell'epidermide (Fig. 49). Nei pannelli A e B della

Figura 49 è possibile apprezzare la differenza nell'immagine della foglia prima e dopo il trattamento *peeling*.

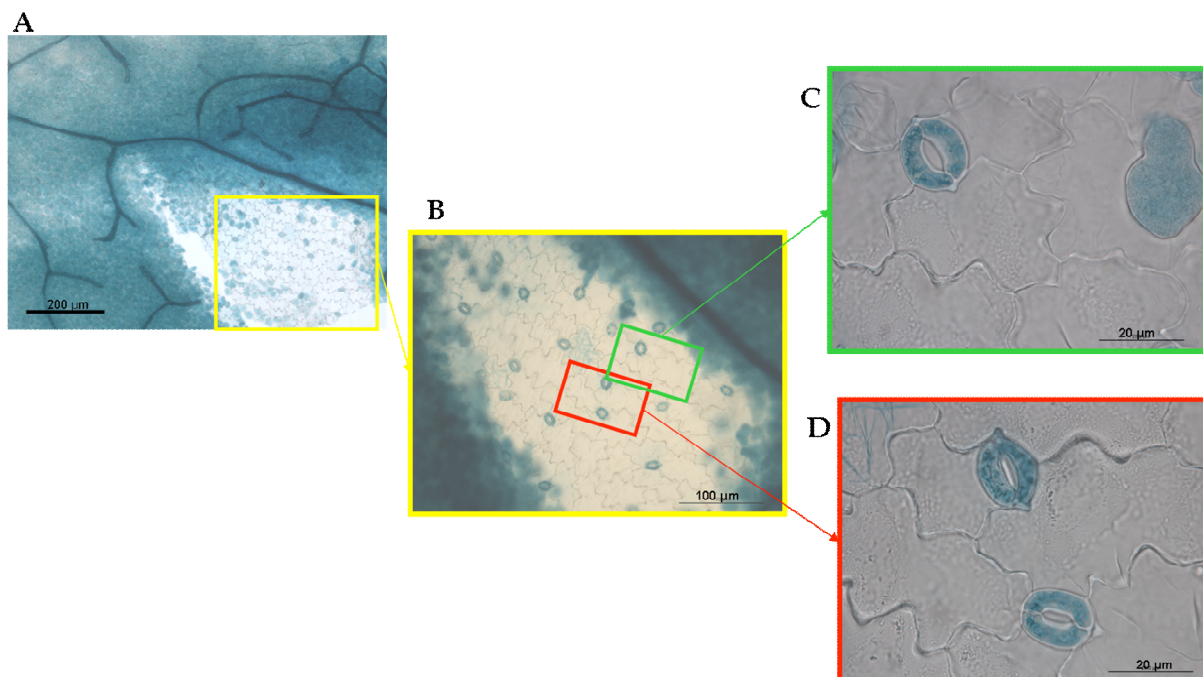


Figura 49: Foto al microscopio ottico dritto dell'analisi del profilo di espressione della fusione *prGLB1-gusA* nelle foglie e nelle epidermidi fogliari a diversi ingrandimenti.

L'attività del promotore di *LjGLB1* nelle cellule di guardia è in accordo con quanto riportato per l'ortologo di *A. thaliana* (*At4g01900*) la cui espressione è stata rilevata in analisi *microarray* nelle cellule di guardia di questa pianta [Leonhardt *et al.* 2004]. Anche in questo caso l'espressione di *AtGLB1* non era limitata alle cellule di guardia, ma veniva riscontrata anche nel mesofillo. La sequenza regolatrice al 5' di *LjGLB1*, disponibile al sito <http://www.kazusa.or.jp/lotus> è stata identificata e caratterizzata *in silico* per l'eventuale presenza di motivi regolatori che fossero consistenti con il profilo di espressione spaziale osservato (Fig. 50). L'analisi delle 980 coppie di basi utilizzate per il costrutto di fusione *prLjGLB1-gusA* ha in effetti rilevato delle interessanti caratteristiche. In particolare, è significativo il ritrovamento di otto elementi T/AAAAG che identificano il motivo di legame del fattore trascrizionale DOF1 (*zinc finger transcriptional factor*) che è stato mostrato essere richiesto per l'attività specifica nelle cellule di guardia del promotore del gene *KST1* di patata [Plesch *et al.* 2001] (Fig. 50). Comunque, la presenza di questi elementi, che sono come nel caso del promotore di *LjGLB1*, presenti in multipla copia nella regione al 5'

dei geni regolati, non sempre è stata associata ad una espressione specifica nelle cellule di guardia [Yang *et al.* 2008]. L'analisi *in silico* ha anche rilevato la presenza di cinque motivi CTCTT associati ad una espressione nel tessuto nodulare. Va però ricordato che questo genere di analisi rappresentano delle semplici predizioni che vanno suffragate da evidenze sperimentali che confermino l'effettivo coinvolgimento degli elementi identificati. Tra l'altro nelle piante, il *database* dei motivi regolatori della trascrizione è ancora piuttosto povero.

CGTTTTTCCCCAGTAACCGTTTT**CTTTT**GTTGGTCAAATCAGTAACCGTTTCATCACTTGCA
 ACTTGCGTCACAATGAGCCCGGCCCGTTTCATACCATTGAAGATTTGGGTCTGTGTTTAAAA
 CCCAATGTAAAC**CTTTT**ATCTTTGTCCAAAAAAAAAAAAACAAAAACAAAA**AAAAG**CCCTGC
 GTAAGTAGTGACCAAAGAATTTATGCTTAGATTTTTTATAGTCCCTAGACTATATATACCA**AA**
GAGAAATGGTGTCAACATTCCC**CTTTT**AACACTCTATTTTGTGTTAAATTCATGTAGTG
 TCCACCAATTATATGGGGCTTACTCCTAATTTAGTGGGGGCATGAGTGAATTTTGGACACTA
 CGTGAATTTTAGTCAAT**TAAAG**TGAGAATGTTAGAAAGAAAGTGTGA**AAAAGAG**TGTTGTTA
 GCACTCCACATATTACAGATATTGGTTTTTCATCCCTGAAAAATATTTTGTAGTTTTTTAATCC
 CTAGAAAGTTATATTGTTTTTTGTTTTATTAGTTATTATTAAGTTTCACCTATTGATTCGC
 ACAACGATTACTCG**CTCTT**TCTACTTAGAGTTTTGTCATCCGATTTGGCACAGTGAGTTTCA
 CCATACAAATAGGG**AAAAG**TTTGGACATTGTTGTCCTTAGAGATTTTGTGGCGAGTGATTTG
 AAATGACGACAATAAGTCTAACTACGGTGGCGATGGAAGTCATGGGTGTGAATGCATGGGTC
 CCTGCGTGCCAAATTAGATTAAAAAACTCCAAGTAGG**AAGAG**TGGTCATGTGTGAGATACAT
 AAAC**AAAAG**TCAACAACACTAAACATATAAAAAACAAAAAAATGTGCAGGACTAAACC
 AACATTTAATATATTTAGAGGGACTAAACATATTTAAGGAAAGAATTTATTCAGCTTATTT
 AATATGGTTCGGTGAGAAAGACAGAGAGTGAGTGCTG**AAGAG**AGAAGCA**ATG**

Figura 50: Regione regolatrice al 5' del gene *LjGLB1*. In grassetto sono indicati: Codone di inizio (nero); Domini di *binding* DOF (Rosso); Domini espressione nodulare (Blu).

In definitiva comunque, il profilo di espressione spaziale osservato nelle piante di *L. japonicus* trasformate con il costrutto di fusione *prGLB1-gusA* e mai riportato fino ad ora in letteratura, ci ha consentito di ipotizzare un coinvolgimento della proteina PII nei noduli e nelle cellule di guardia che al momento non è stato ancora ipotizzato nelle piante superiori.

5.4 Indagini sul ruolo della proteina PII nella nodulazione in *L. japonicus*

Generalmente il numero di noduli nelle piante leguminose è geneticamente controllato mediante un meccanismo di “autoregolazione”; il processo di nodulazione è, infatti, energeticamente molto dispendioso (è stato calcolato che circa il 20% del fotosintato viene allocato al nodulo per permettere lo svolgimento della fissazione dell’azoto da parte del batterio) così da rendere necessario uno stretto controllo di questo meccanismo da parte della pianta. Un’eccessiva nodulazione sarebbe infatti controproducente per le piante, interferendo con la distribuzione dei nutrienti. Per questi motivi, la formazione del nodulo è un processo fortemente dipendente da un corretto equilibrio fra le risorse carboniose (utilizzate come riserva energetica per lo svolgimento del processo) ed azotate (prodotte dalla simbiosi e/o presenti al momento dell’inizio dell’interazione). Nello stesso modo, anche lo sviluppo del nodulo è fortemente dipendente da un corretto bilancio C/N. Quando una sorgente di azoto combinato viene aggiunto a radici nodulate, la crescita e lo sviluppo del nodulo si arrestano e lo strato endodermico cresce fino a circondare progressivamente il meristema apicale di un nodulo indeterminato, che viene inattivato. Quando la sorgente azotata viene rimossa la crescita e l’attività meristemica riprendono [Truchet e Dazzo 1982]. Infine un corretto rapporto C/N è anche alla base di un efficiente funzionamento del nodulo. L’aggiunta dall’esterno di ammonio e/o nitrato ad esempio, è in grado di bloccare l’attività nitrogenasica in noduli maturi, probabilmente determinando una riduzione di O₂ e sorgenti di carbonio al nodulo [Bisseling *et al.* 1978; Streeter 1988]. D’altra parte numerosi sono gli esempi di mutanti di pianta deficienti in funzioni associate al rifornimento degli scheletri carboniosi essenziali per la fissazione azotata che presentano una ridotta attività nitrogenasica. Normalmente questi mutanti esibiscono una normale cinetica di nodulazione fino al momento in cui la fissazione azotata normalmente comincia, cercando poi di compensare il fenotipo fix con un aumento del numero di noduli e conseguenti effetti gravemente dannosi per la pianta [Gordon *et al.* 1999; Cordoba *et al.* 2003; Suganuma *et al.* 2003; Krussell *et al.* 2005; Nomura *et al.* 2006]. Per questo motivo la caratterizzazione del fenotipo simbiotico delle piante *over-esprimenti* PII si è focalizzata su questi vari aspetti della nodulazione.

5.4.1 Analisi del fenotipo di nodulazione nelle piante *PII-over* A.9.6 in condizioni permissive per la simbiosi azoto-fissativa

Una prima caratterizzazione fenotipica nelle linee *over*-esprimenti è stata fatta per verificare se questo alterato livello di espressione comportasse una differenza nel numero di noduli formati in condizioni permissive. Semi di piante di *L. japonicus wild type* e *PII-over* A.9.6 sono stati seminati e germinati su piastre con un mezzo contenente come unica risorsa azotata 10 μM NH_4NO_3 (AN, ammonio nitrato). Questa bassa concentrazione di fonte azotata consente normalmente un'efficiente nodulazione (condizioni permissive). Quando le piante hanno raggiunto una dimensione di circa 4-5 cm sono state infettate con il batterio simbionte *M. loti*, in modo da innescare il processo di formazione dei noduli azoto-fissatori. Dopo 4 settimane dall'infezione con *M. loti*, è stata eseguita l'analisi dell'efficienza di nodulazione nei due genotipi posti a confronto (*wild type* e *PII-over* A.9.6) (Fig. 51A).

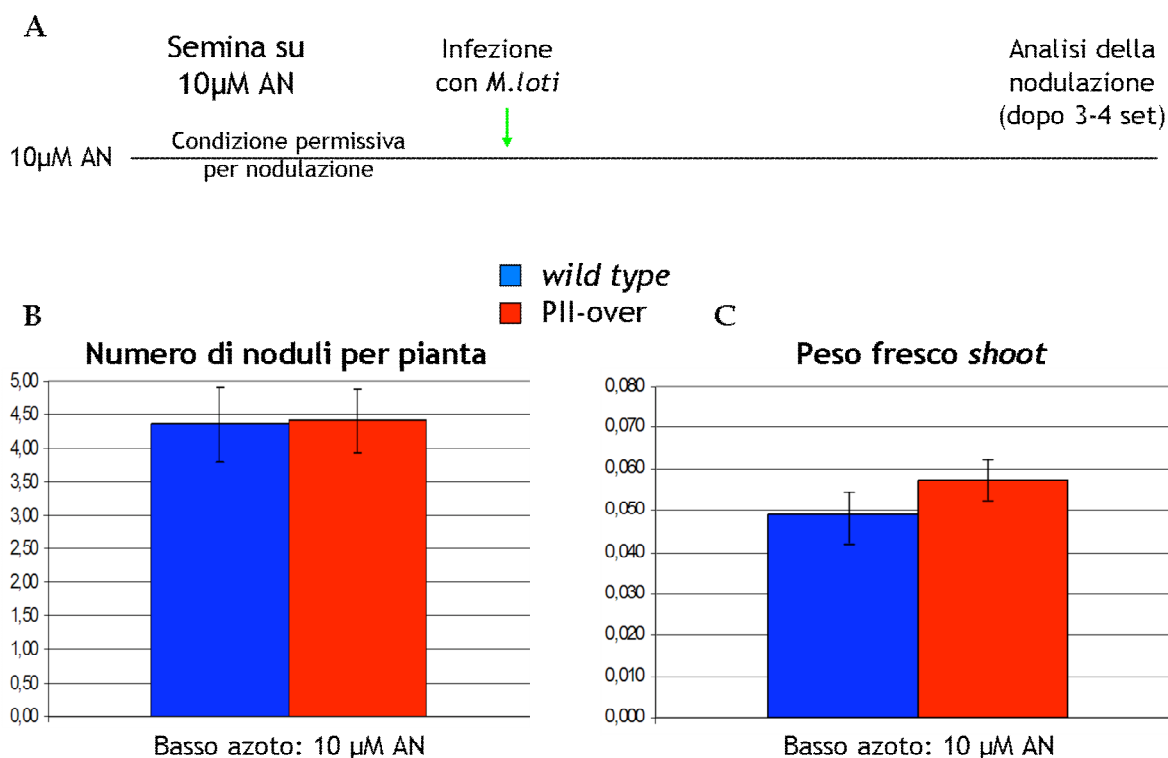


Figura 51: Analisi del fenotipo di nodulazione delle piante di *L. japonicus* che *over*-esprimono il gene *GLB1*, paragonate alle piante *wild type*. AN: ammonio nitrato (A) Schema sperimentale. (B) Grafico del numero medio di noduli per pianta dopo 4 settimane dall'infezione con *M. loti*. (C) Grafico del peso fresco dello shoot delle piantine di *Lotus japonicus* dopo 4 settimane dall'infezione.

Il numero medio di noduli per pianta restava inalterato confrontando le piante *wild type* e *over-esprimenti* (4-5 noduli; Fig. 51B). Inoltre, il funzionamento dei noduli e quindi la quantità di azoto allocata alla parte aerea della pianta, non sembra essere alterato nelle piante *over-esprimenti*. Infatti, pur non effettuando una misura diretta dell'attività nitrogenasica, il peso fresco comparabile delle piante *wild type* e *over-esprimenti* indica un funzionamento normale dei noduli nei due genotipi (Fig. 51C). Allo stesso modo e consistentemente con questi risultati, il fenotipo di sviluppo dei noduli non è alterato, in condizioni permissive nelle piante *over-esprimenti*. Sezioni longitudinali ottenute al vibratomo di noduli di piante *wild type* e *PII-over* A.9.6 di 55-60 µm di spessore, non hanno mostrato particolari differenze morfologiche e ultrastrutturali tra le piante *wild type* e quelle *over-esprimenti* il gene *GLB1* (Fig. 52). Infine, la comparazione di sezioni di noduli ottenuti dopo inoculazione con il ceppo *wild type* di *M. loti* e con un ceppo *nifH⁻* (dinitrogenasi reductasi), che è capace di indurre la formazione di noduli normali che però non fissano l'azoto (fenotipo Nod⁺, Fix⁻) ha confermato che il gene *GLB1* non sembra essere coinvolto nei processi associati al funzionamento del nodulo. L'analisi microscopica sulla localizzazione spaziale dell'attività GUS ha infatti consentito di verificare che il profilo di espressione del gene a livello del sistema vascolare e dell'*inner cortex* non variava in dipendenza della presenza di azoto ridotto nel nodulo (Fig. 53).

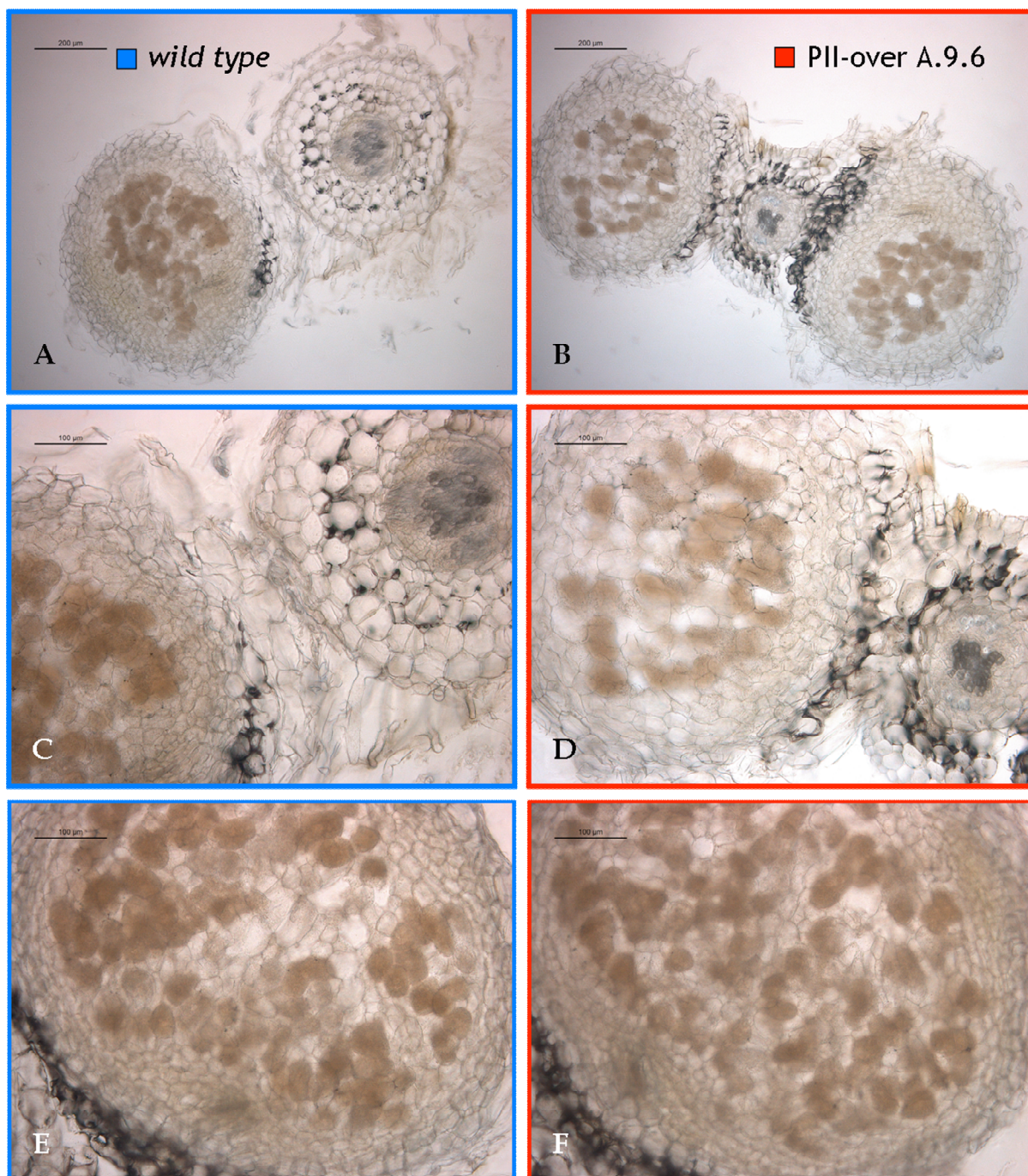


Figura 52: Foto al microscopio ottico dritto di sezioni longitudinali di noduli di 55-60 μm di spessore, ottenute al vibratomo. (A,C,E) Diversi ingrandimenti di noduli di piante *wild type*. (B,D,F) Diversi ingrandimenti di noduli di piante *PII-over A.9.6*.

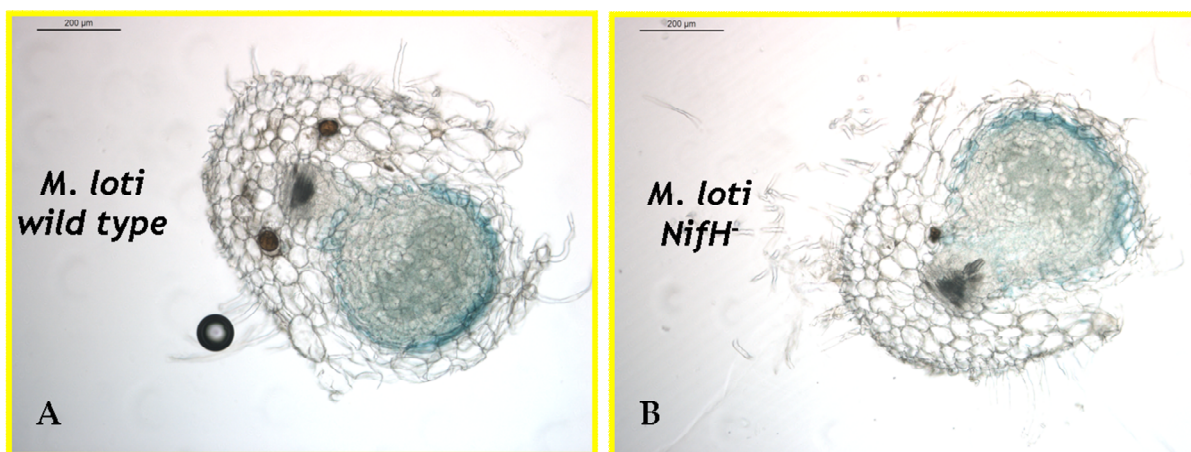


Figura 53: Foto al microscopio ottico dritto di sezioni longitudinali di noduli di 55-60 μm di spessore, ottenute al vibratomo di noduli transgenici di *L. japonicus* trasformati con il costrutto di fusione *prGLB1-gusA* ed ottenuti dopo inoculazione con *M. loti* wild type (A) e *M. loti nifH⁻* (B).

5.4.2 Analisi del fenotipo di nodulazione in piante *wild type* e *PII-over* A.9.6 pre-incubate in alto azoto

Recentemente, è stato riportato in letteratura che piante di *L. japonicus* pre-incubate in differenti condizioni azotate (alto e basso azoto) mostrano una diversa competenza per il processo di nodulazione. In particolare, piante pre-incubate per 10 giorni in 10 mM ammonio nitrato (condizione inibitoria per la nodulazione), mostrano una ridotta capacità nodulante, una volta trasferite in condizioni permissive (10 μM ammonio nitrato), rispetto a piante che non hanno subito questo trattamento preventivo [Omrane *et al.* 2009].

Abbiamo quindi deciso di effettuare un'ulteriore caratterizzazione del fenotipo di nodulazione nelle linee *over*-esprimenti per verificare se l'alterato livello di espressione comportasse una differenza nel fenotipo di nodulazione in piante pre-incubate per 10 giorni su un substrato contenente 10mM NH_4NO_3 . Piante *wild type* e *PII-over* A.9.6 sono state cresciute su 10mM o 10 μM NH_4NO_3 e, successivamente, trasferite su un terreno contenente 10 μM NH_4NO_3 , prima dell'infezione con *Mesorhizobium loti* (Fig. 54A). Dopo 6 giorni dall'infezione le piantine sono state trasferite su nuove piastre contenenti lo stesso mezzo di coltura con l'aggiunta dell'antibiotico cefotaxime (cef). Questo permette di bloccare la crescita e lo sviluppo dei batteri presenti ancora all'esterno del tessuto vegetale, per impedire ulteriori cicli

di infezione e poter valutare l'effetto della pre-incubazione sull'efficienza di nodulazione. Come atteso, in tre esperimenti indipendenti (circa 25 piante per esperimento) è stato visto che la percentuale delle piante nodulanti si riduceva di circa il 30% nelle piante *wild type* pre-incubate su 10mM NH_4NO_3 , rispetto a quelle pre-incubate su 10 μM NH_4NO_3 con un numero medio di noduli per pianta ridotto del 57% (1,4 vs 3,2 noduli/pianta: Fig. 54B-C). Sorprendentemente, questa riduzione non si osservava nelle piante *PII-over* A.9.6, in cui la percentuale di piante nodulanti si riduceva solo al 92% ed il numero medio di noduli per pianta si riduceva solo del 24% (1.4 vs 3.1 noduli/pianta Fig. 54B-C).

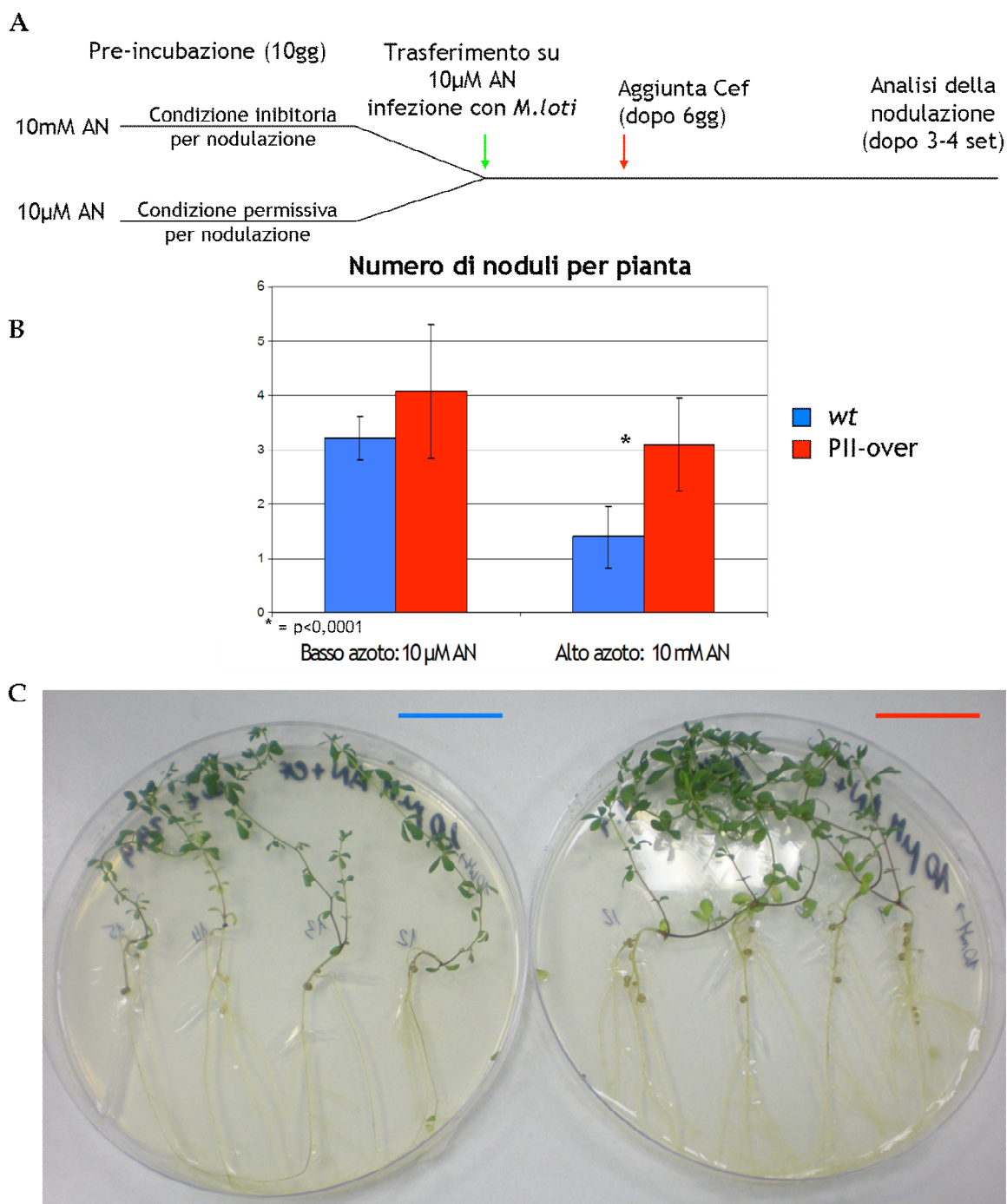


Figura 54: Analisi del fenotipo di nodulazione in piante di *L. japonicus wild type* (*wt*) e *PII-over* A.9.6 pre-incubate per 10 giorni in 10 mM NH_4NO_3 (AN) o 10 µM NH_4NO_3 e poi trasferite tutte su 10 µM NH_4NO_3 ed infettate con *M. loti*. (A) Schema sperimentale. (B) Grafico del numero medio di noduli per pianta dopo 4 settimane dall'infezione con *M. loti*. (C) Foto di piantine *wild type* e *PII-over* A.9.6 pre-incubate su 10 mM AN a confronto. Le barre rappresentano il valore medio del numero di noduli ottenuto in tre esperimenti indipendenti e la SEM di questi valori è riportata.

Questi risultati indicano un coinvolgimento del gene *GLB1* nel processo di nodulazione della pianta modello *L. japonicus* con il suo partner simbiotico *M. loti* che è consistente con il profilo di espressione spaziale del gene *GLB1*. Questo

coinvolgimento andrà confermato con ulteriori esperimenti per valutare il fenotipo di nodulazione anche sulla seconda linea omozigote *PII-over* 7.14.10.

Per quanto riguarda il meccanismo di azione di PII, due esperimenti indipendenti di qRT-PCR indicano che il gene *GLB1* presenta lo stesso livello di espressione nelle radici di piante *wild type* cresciute per 10 giorni su 10 μ M NH_4NO_3 o 10 mM NH_4NO_3 (Fig. 55).

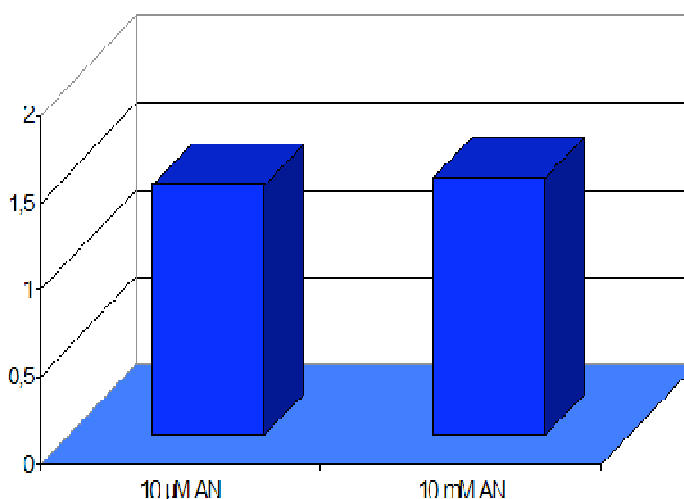


Figura 55: Analisi qRT-PCR del gene *GLB1* in radici di piante *wild type* cresciute su 10 μ M o 10 mM NH_4NO_3 (AN).

5.5 Analisi del livello delle poliammine in piante *wild type* e *PII-over* A.9.6

Come accennato nel capitolo dell' "Introduzione", le poliammine spermidina e spermina ed il loro precursore putrescina, svolgono un ruolo cruciale nei meccanismi alla base dello sviluppo delle piante (embriogenesi del polline, rizogenesi, sviluppo di fiori e frutti, senescenza) e numerosi sono i dati che riconoscono il loro coinvolgimento in funzioni fisiologiche vegetali quali allungamento del fusto, morfologia delle foglie ed accrescimento delle radici, apertura stomatica, anche se ancora poco si sa riguardo i meccanismi molecolari associati. Esse si trovano distribuite in quasi tutti gli organi vegetativi e riproduttivi (radici, foglie, fiori, semi, tuberi, meristemi, xilema, floema e tessuti parenchimatici) localizzate principalmente nel vacuolo, nel nucleo, nei mitocondri, nei cloroplasti, nei ribosomi e nelle membrane [Alcazar *et al.* 2010]. In aggiunta alla loro funzione nello sviluppo delle piante, le poliammine giocano un ruolo nei meccanismi di risposta a stress biotici ed

abiotici; infatti i loro livelli nei tessuti vegetali aumentano in seguito a numerosi tipi di stress abiotici e nelle risposte di difesa [Liu *et al.* 2000]. Inoltre, nelle piante leguminose le poliammine sembrano essere coinvolte nella regolazione della nodulazione [Flemetakis *et al.* 2004; Efrose *et al.* 2008]. Un aumento delle quantità di poliammine, di pari passo con un aumento di espressione dei geni coinvolti nella loro sintesi, è stato riscontrato durante lo sviluppo nodulare e nei noduli maturi di *L. japonicus* così come un accumulo sistemico di queste molecole a basso peso molecolare in radici, fusti e foglie di piante nodulanti rispetto a piante non inoculate con *M. loti* [Flemetakis *et al.* 2004; Efrose *et al.* 2008]. Anche in questo caso l'esatto ruolo funzionale giocato da questi fattori non è stato ancora delucidato. Dal momento che si è dimostrato che la proteina PII è coinvolta nei *pathway* biosintetici che portano alla sintesi di potenziali substrati per la sintesi di poliammine (paragrafo 1.4.1 e Fig. 40 dell'Introduzione) ci è sembrato interessante confrontare il livello di queste nelle piante *wild type* e *PII-over* A.9.6 di *L. japonicus*. Questa procedura è stata effettuata in collaborazione con il laboratorio del prof. Sergio Esposito dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II", secondo il protocollo riportato in Liu *et al.* 2000, partendo da 1g di tessuto fresco fogliare e 0,1-0,5g di radici o noduli maturi di piante di *L. japonicus* cresciute in terreno o *in vitro*. L'analisi sperimentale all'HPLC ha mostrato un aumento della spermina e una quasi totale scomparsa della spermidina nelle foglie *PII-over* A.9.6 rispetto alle piante *wild type*. Spermidina e spermina non variano in maniera significativa negli altri organi analizzati così come la putrescina (Fig. 56).

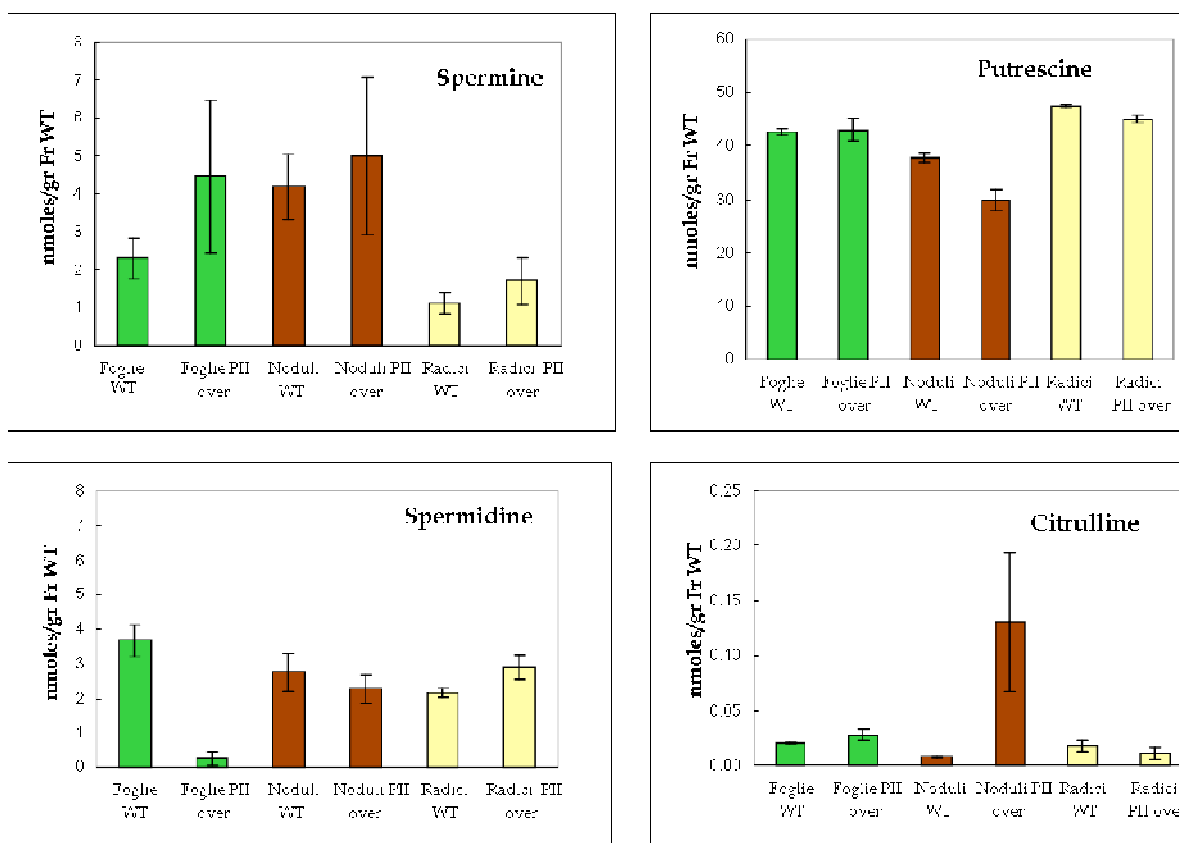


Figura 56: Analisi dei livelli della Spermina, della Putrescina, della Spermidina e della Citrullina nelle foglie (barre verdi), noduli maturi (barre marroni) e radici (barre gialle) di piante di *L. japonicus* wild type e PII-over A.9.6 cresciute *in vivo* (foglie) o *in vitro* (radici e noduli).

Nelle piante, la putrescina (put) che rappresenta il precursore di spermidina e spermina, può essere sintetizzata attraverso due distinti *pathway* (Fig. 40 e 57). A partire da ornitina, attraverso l'attività della ornitina deidrogenasi e, indirettamente dall'arginina via arginina decarbossilasi. Per quanto riguarda la spermidina (spd) e la spermina (spm) gli enzimi chiave coinvolti sono la S-adenosylmetionina-decarbossilasi (SAMDC), la spermidina chinasi (SPDS) e la spermina sintasi (SPMS) (Fig. 57). La SAMDC decarbossila la S-adenosylmetionina (SAM) producendo i gruppi aminopropilici richiesti per la sintesi di spermidina e spermina (Fig. 57). Inoltre, le poliammine sono catabolizzate da due classi di amino-ossidasi, una amino-ossidasi Rame-dipendente (CuAO o DAO, diammina ossidasi; EC 1.4.3.6) ed una FAD-dipendente (PAO, poliammina ossidasi; EC 1.5.3.3) che determinano la produzione di ammonio e H₂O₂ (Fig. 57). Le diammine ossidasi catalizzano l'ossidazione dei gruppi amminici primari della diammina Put formando il 4-aminobutanale che spontaneamente ciclizza a Δ^1 -pirroline (Fig. 57). Queste ultime

reazioni cataboliche determinano delle reazioni inverse che portano anche alla produzione di spermidina e putrescina, rispettivamente da spermina e spermidina [Tisi *et al.* 2011]. Il quadro dei *pathway* biosintetici che portano alla biosintesi delle poliammine in pianta è quindi estremamente complesso ed i dati ottenuti all'HPLC potrebbero essere spiegati attraverso un coinvolgimento della PII nelle vie metaboliche e/o cataboliche (Fig. 57). In particolare, l'aumento di spermidina e la diminuzione di spermina nelle foglie delle piante *PII-over* potrebbe essere dovuta ad un'induzione dell'espressione/attività della SPMS e/o ad una repressione dell'espressione/attività della PAOs.

L'analisi mostrata in Figura 56 ha consentito anche di rilevare il contenuto di citrullina ($C_6H_{13}N_3O_3$). È estremamente interessante notare il forte, specifico accumulo di questa molecola nel tessuto nodulare (circa 7 volte). La citrullina può essere sintetizzata nelle piante a partire dalla ornitina attraverso la reazione catalizzata dalla ornitina-carbamoil-transferasi (OTC) o dalla presunta NO-sintasi (NOS) la cui esistenza nelle piante è ancora oggetto di dibattito (Fig. 40).

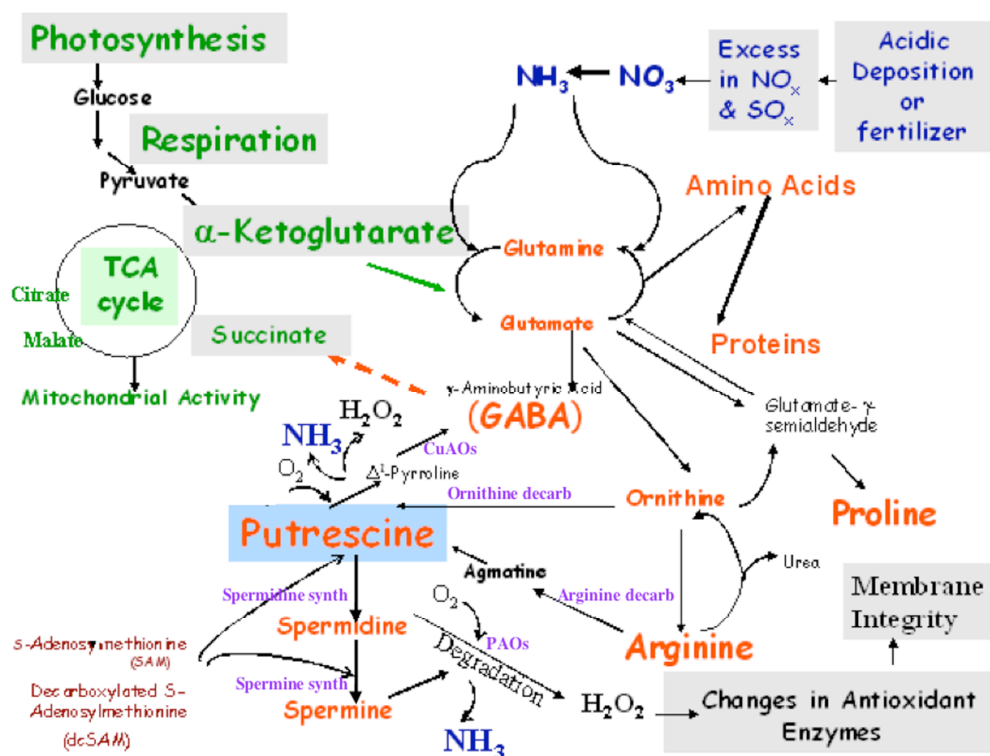


Figura 57: Vie biosintetiche e cataboliche che coinvolgono le poliammine nei vegetali.

5.6 Ruolo della proteina PII di *L. japonicus* nel meccanismo di apertura/chiusura degli stomi

L'espressione del gene codificante per la proteina PII in *L. japonicus* nelle cellule di guardia degli stomi ci ha spinto ad indagare sul ruolo eventuale di PII sul meccanismo di apertura/chiusura degli stomi attraverso la caratterizzazione fenotipica delle linee *over*-esprimenti PII.

Nel mio soggiorno in Francia presso i laboratori del Dott. Vavasseur ho effettuato numerosi esperimenti sull'epidermide delle piantine di *Lotus japonicus wild type* e *PII-over* A.9.6 e 7.14.10 per verificare in modo diretto il coinvolgimento di PII nella regolazione dell'apertura/chiusura degli stomi. In particolare, in un primo *set* di esperimenti ho valutato l'efficienza di apertura stomatica nelle piante in esame in seguito a trattamenti con ABA, un fitormone che induce la chiusura degli stomi. Dopo aver preparato i vetrini con l'epidermide fogliare di diverse foglie indipendenti di piante di *L. japonicus wild type* e *PII-over* A.9.6 e 7.14.10 di circa 2 mesi, questi sono stati posti per 3 ore alla luce, per garantire una corretta apertura stomatica. È stata quindi effettuata una meticolosa analisi al microscopio per valutare il grado di apertura stomatica degli epidermidi fogliari preparati con la metodica descritta da Perfus-Barbeoch *et al.* 2002 modificata per le piante di *L. japonicus* in cui il mesofillo fogliare risulta particolarmente adeso all'epidermide. La pagina inferiore (abassiale) delle pellicole fogliari viene incollata su un vetrino coprioggetti con una particolare colla al silicone (Telesis™ silicone adhesive), che non impedisce i movimenti stomatici. Il grado di apertura stomatica è stato misurato al microscopio ottico (Nikon Optiphot-2) dotato di una camera lucida ed una lavagnetta digitale, collegate ad un computer ed analizzato con il *Software Terminal-Kookoo.trm*. Sono stati analizzati circa 70 stomi per ognuno dei tre campioni biologici analizzati per ciascun genotipo in meno di 5-7 minuti. I vetrini sono stati quindi sottoposti a trattamento con 10 μ M ABA per un'ora ed è stato nuovamente valutato il grado di apertura stomatica, per vedere se le piantine *wild type* e le piantine *PII-over* A.9.6 e *PII-over* 7.14.10 rispondevano in maniera diversa a questo trattamento. Come atteso, il trattamento con ABA induceva la chiusura stomatica ma questa avveniva con la

stessa efficienza e cinetica nei diversi genotipi analizzati (Fig. 58A). Risultati analoghi sono stati ottenuti utilizzando una più bassa concentrazione di ABA, pari a 1 μM (dati non mostrati).

In un secondo set di esperimenti ho invece prelevato steli uniformi di piantine *wild type* e *PII-over* A.9.6 (con 3-4 trifoli a partire dagli apici) tappando il sito di taglio con della colla per bloccare la perdita d'acqua attraverso i fasci vascolari. Ho quindi effettuato un esperimento di *time course*, in cui il prelevamento delle foglie e la preparazione delle epidermidi mediante la metodica del *peeling*, venivano effettuate al tempo 0, dopo 1 ora e dopo 2 ore. Come nel precedente esperimento, l'osservazione microscopica e la misura delle aperture stomatiche nei vari campioni è stata effettuata in tempi brevissimi. Nel corso di questo esperimento è stata osservata una grossa differenza tra le piante *wild type* e le piante *PII-over* A.9.6, con queste ultime che mostrano un livello costitutivo (osservabile già al tempo T_0) di apertura stomatica molto più basso rispetto alle *wild type* (Fig. 58B).

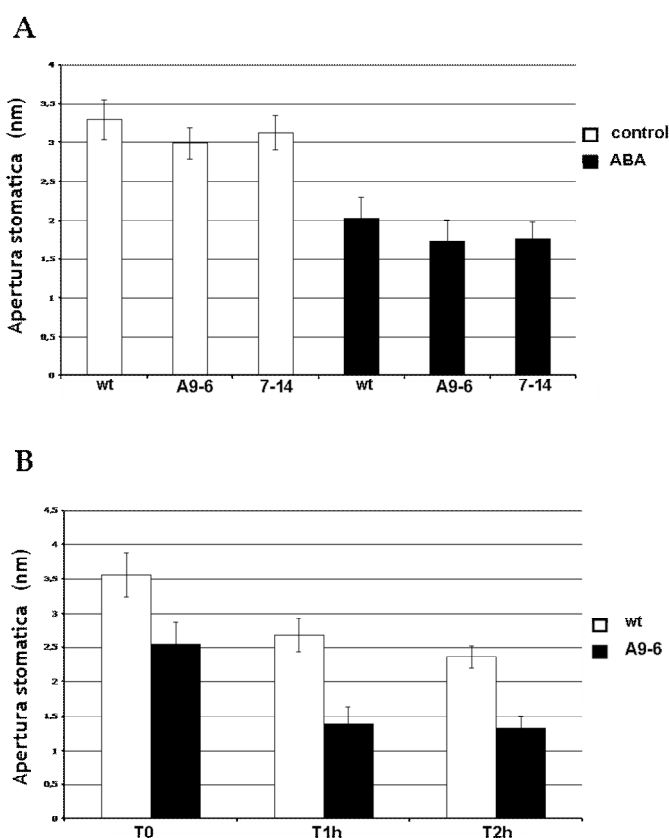


Figura 58: Analisi del grado di apertura stomatica in epidermidi fogliari di *L. japonicus* sottoposti a diversi trattamenti. (A) Osservazione dell'apertura stomatica di epidermidi posti per 3 ore alla luce (barre bianche) e in seguito a trattamento per 1 ora con ABA 10 μM (barre nere). (B) Grado di apertura stomatica in foglie di apici *wild type* (barre bianche) e *PII-over* A.9.6 (barre nere) dopo la separazione dal resto della pianta.

5.7 Ruolo di PII nella regolazione della traspirazione e nella risposta allo stress idrico in piante di *L. japonicus*

5.7.1 Analisi del tasso di traspirazione nelle piante *over-esprimenti*

La maggiore chiusura stomatica osservata nelle piante *over-esprimenti* il gene *GLB1* è stata successivamente correlata ad altri fenotipi di risposta a condizioni di stress idrico. Ho eseguito quindi esperimenti per valutare il grado di traspirazione delle piante *wild type* e *PII-over* A.9.6 e 7.14.10. Apici uniformi di diverse piantine cresciute *in vivo* nella camera di propagazione (23°C, 16 ore luce/8 ore buio, 75% umidità) sono stati prelevati e lasciati al buio dopo aver bloccato la perdita d'acqua attraverso i fasci vascolari con la colla. In questo modo, mediante l'analisi del peso con una bilancia analitica, è possibile valutare nel tempo la perdita d'acqua per traspirazione. Il peso degli steli è stato verificato ogni 10 minuti, per 3 ore e sono state disegnate delle curve mettendo in relazione il variare del peso nel tempo. La riduzione di peso è correlata alla quantità di acqua persa per traspirazione. In tutti gli esperimenti eseguiti per entrambe le due linee *over-esprimenti* è stato osservata una minor perdita d'acqua delle piante *over-esprimenti* rispetto alle piante *wild type* in accordo con le misure di apertura stomatica descritte precedentemente (Fig. 59).

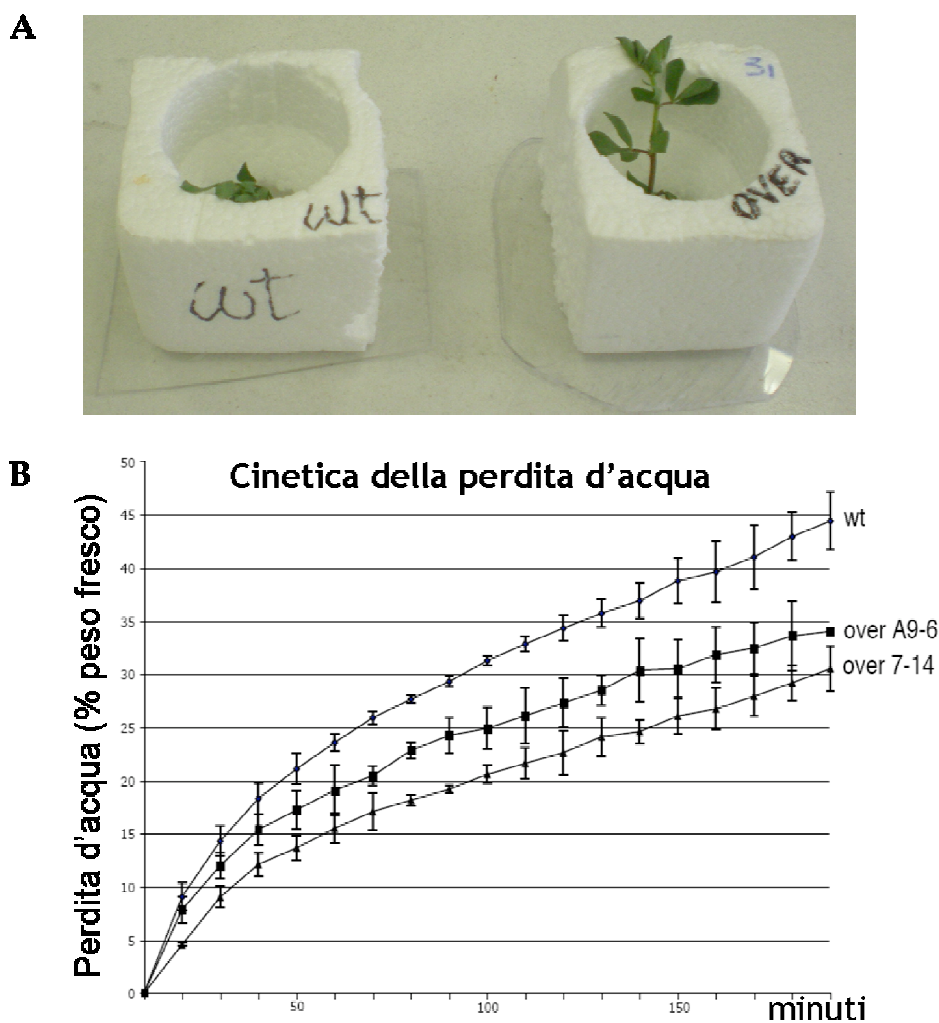


Figura 59: Analisi del tasso di traspirazione in piante di *L. japonicus* wild type (wt) e *PII-over* A.9.6 e 7.14.10. (A) Foto delle porzioni di stelo di piante wild type e *PII-over* A.9.6 alla fine dell'esperimento di valutazione del tasso di traspirazione (dopo 3 ore dal taglio). (B) Grafico della cinetica della perdita d'acqua in relazione al tempo (minuti).

5.7.2 Valutazione del *Ratio Water Content* (RWC)

Per un'ulteriore conferma del coinvolgimento della proteina PII nella regolazione delle risorse idriche delle piante di *L. japonicus* attraverso il controllo dell'apertura stomatica delle cellule di guardia, ho effettuato degli esperimenti per valutare il RWC (*ratio water content*) di piante wild type e *PII-over* sottoposte a vari trattamenti. Piantine di *L. japonicus* wild type e *over-esprimenti* sono state sottoposte a condizioni di stress idrico interrompendo l'aggiunta di acqua. Per entrambi i genotipi sono stati utilizzate come controllo piante innaffiate regolarmente. Da tutte le piante sono stati

prelevati degli apici fogliari uniformi per peso e struttura dopo 3, 5, 7, 9 giorni dall'interruzione della distribuzione d'acqua. È stato valutato il peso fresco, il peso al massimo turgore (dopo incubazione di 24 ore in piastra *Petri* sigillata contenente acqua) ed il peso secco (dopo incubazione in stufa a 80°C per 2 giorni) ed infine è stato valutato l'RWC per tutte le piante, come descritto nel capitolo dei "Materiali e Metodi". In tutti gli esperimenti analizzati è stato osservato che le piante *over-esprimenti* in condizioni di stress idrico hanno un RWC più alto rispetto alle piante *wild type* (Fig. 60).

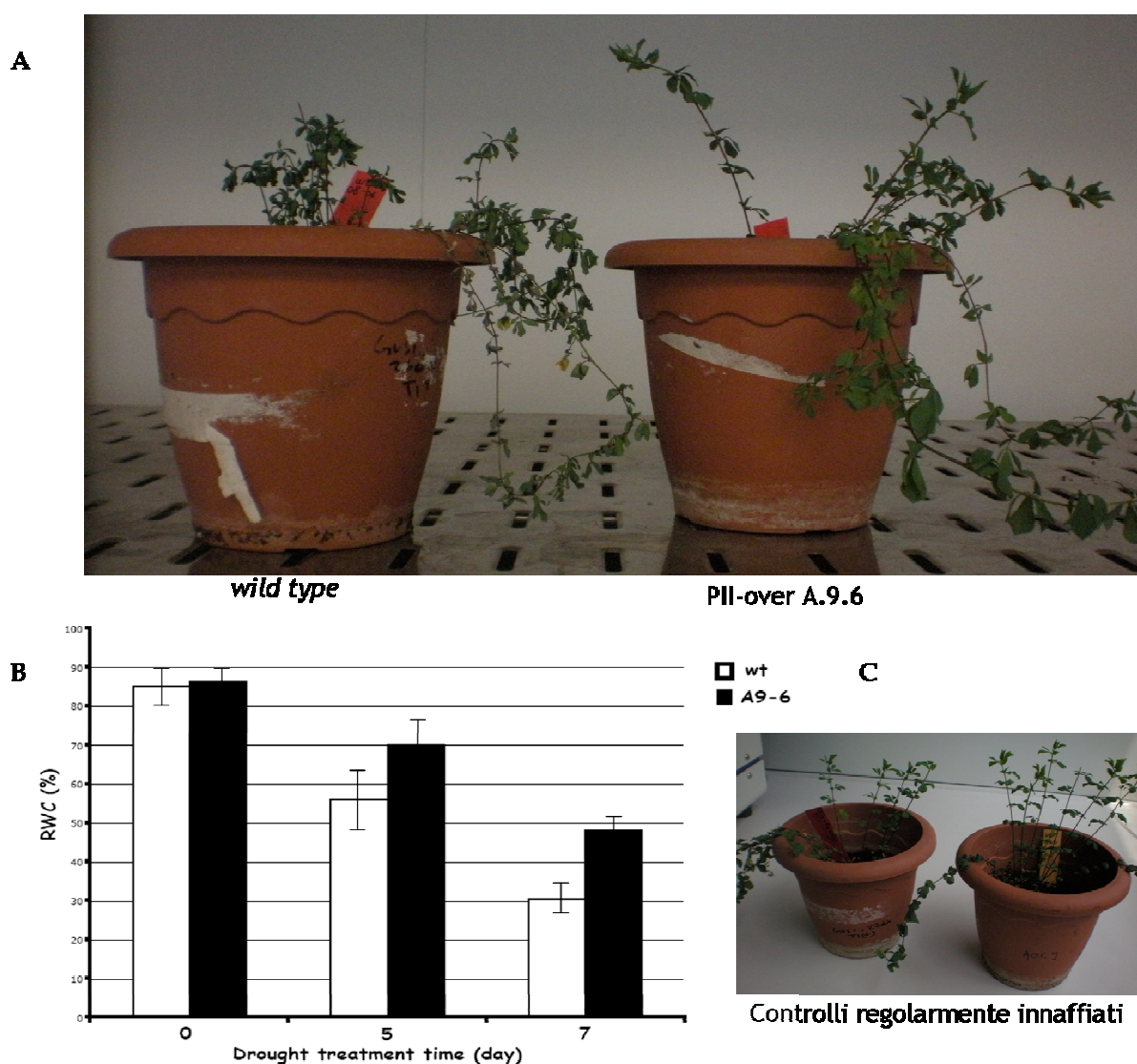


Figura 60: Valutazione del *Ratio Water Content* (RWC) in piante di *L. japonicus wild type* (wt) e *PII-over A.9.6* sottoposte a condizioni di stress idrico per diversi giorni. (A) Foto delle piante *wild type* e *PII-over A.9.6* dopo 12 giorni di trattamento di stress idrico. (B) Grafico della percentuale di *Ratio Water Content* in funzione del tempo in piante *wild type* (barre bianche) e *PII-over A.9.6* (barre nere). (C) Foto delle piante *wild type* (a sinistra) e *PII-over A.9.6* (a destra) regolarmente innaffiate e usate come controlli.

Tutti questi esperimenti nel complesso confermano la ridotta apertura stomatica costitutiva delle piante *over-esprimenti* il gene *GLB1* rispetto alle piante *wild type*, che conferisce un fenotipo di maggiore resistenza alle condizioni di stress idrico in queste piante.

5.7.3 Time course del profilo di espressione di *GLB1* durante condizioni di stress idrico indotto

Per comprendere meglio il comportamento del gene *GLB1* in condizioni di stress idrico, è stato valutato il profilo di espressione di questo gene nelle piante *wild type* in cui è stato indotto stress idrico per totale interruzione della distribuzione di acqua. La sequenza dei *primer* utilizzati nelle diverse analisi di qRT-PCR, la temperatura di fusione di ciascun *primer* (T_m) e le dimensioni in coppie di basi del prodotto di amplificazione per ciascuna coppia, sono riportati nel capitolo dei “Materiali e metodi”. Nello stesso capitolo sono riportati anche i programmi di PCR utilizzati per l’amplificazione dell’ubiquitina, di *LjGLB1* e del gene *up-regolato* e quello *down-regolato* in condizioni di siccità (*drought*). Infatti, oltre al gene dell’ubiquitina comunemente utilizzato come *standard* interno nei nostri esperimenti, ho utilizzato anche due geni di *L. japonicus* che sono stati riportati essere *up-* o *down-regolati* in condizioni di stress idrico [Diaz *et al.* 2010]. I geni utilizzati sono classificati sulla base del *database* con il sequenziamento genomico di *L. japonicus* (HYPERLINK “<http://www.kazusa.or.jp/lotus>”) come **chr4.CM0333.880.r2.d** (*up-regolato*) che è un omologo del gene **At4g16160** codificante una proteina presente nei pori di *A. thaliana* anch’esso *up-regolato* da stress idrico e **chr6.CM0679.380.r2.m** (*down-regolato*) omologo del gene **AT2G40610.1** (anch’esso *down-regolato* da stress idrico) codificante l’espansina di *A. thaliana* **Q9FNT0**. L’analisi dell’espressione endogena del gene *GLB1* nelle piante *wild type* mostra una significativa risposta di questo gene alle condizioni di stress idrico con una forte e progressiva *down-regolazione* a partire da tre giorni di trattamento (4-10 volte; Fig. 61).

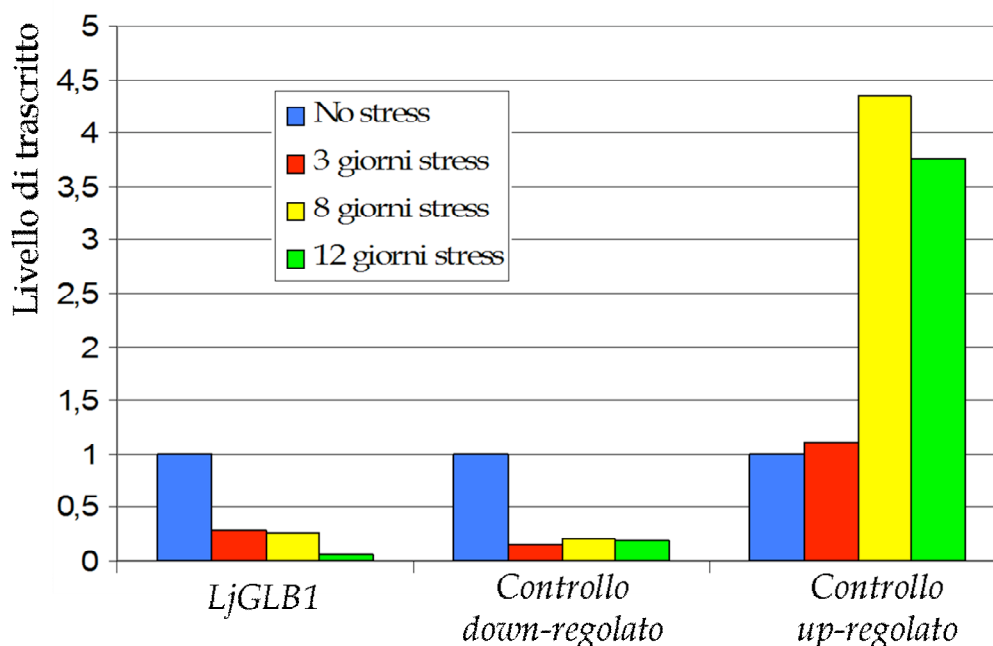


Figura 61: *Time course* del profilo di espressione del gene *GLB1* di *L. japonicus* durante stress idrico indotto dalla completa interruzione di acqua. L'analisi mediante semiqRT-PCR è stata effettuata a partire da cDNA ottenuto da RNA prelevato da piante *wild type* regolarmente innaffiate (barre blu), e dopo 3 giorni (barre rosse), 8 giorni (barre gialle) e 12 giorni (Barre verdi) dall'inizio dello stress idrico indotto.

5.8 Coinvolgimento della proteina PII di *L. japonicus* nella regolazione dell'attività dell'enzima nitrato reduttasi

Recenti lavori in letteratura indicavano il coinvolgimento di PII nella regolazione dell'assorbimento di nitrito nei cloroplasti di *Arabidopsis thaliana* [Ferrario-Mery *et al.* 2008]. Questo dato può avere una diretta e/o indiretta correlazione con l'espressione da noi verificata nelle cellule di guardia degli stomi. Infatti, nelle piante superiori il nitrito rappresenta una fonte di NO che è un segnale importante per la regolazione dell'apertura stomatica. Come descritto nel capitolo dell' "Introduzione", il nitrito è sintetizzato nel citosol dalla riduzione del nitrato mediante l'enzima nitrato reduttasi (NR) e successivamente traslocato nei cloroplasti per essere ulteriormente ridotto ad ammonio dalla nitrito reduttasi (NiR). L'enzima NR nei vegetali è tipicamente citosolico ed impiega come donatore di elettroni NAD(P)H; esistono differenti tipologie di isoenzimi riportati in letteratura NADH-specifici (EC 1.6.6.1) e NAD(P)H-bispecifici (EC 1.6.6.2). Nelle foglie e nelle radici di *L. japonicus* la NR utilizza principalmente NADH come agente riducente. L'enzima è codificato dal

gene *Nia*, espresso soprattutto nelle radici [Marquez *et al.* 2005]. Sulla base dei lavori precedentemente riportati in letteratura da Ferrario-Mary e collaboratori, ho cercato di verificare se la *over*-espressione della proteina PII portasse ad una de-regolazione della produzione di nitrito. Ho effettuato dei saggi di attività dell'enzima nitrato riduttasi (NR) in piante *wild type* e *PII-over* A.9.6, per verificare se c'era una differenza nell'attività di quest'enzima. La determinazione dell'attività nitrato riduttasica viene compiuta determinando la presenza di nitrito prodotto, nella reazione che usa il NADH come donatore di elettroni ed il nitrato di sodio come substrato. Il saggio enzimatico, ha permesso di verificare che l'attività specifica della nitrato riduttasi è significativamente maggiore nelle piante *PII-over* A.9.6 rispetto alle piante *wild type* (Fig. 62B-D). Questa differenza nell'attività nitrato riduttasica si può osservare dopo 10, 20 e 30 minuti dall'inizio del saggio.

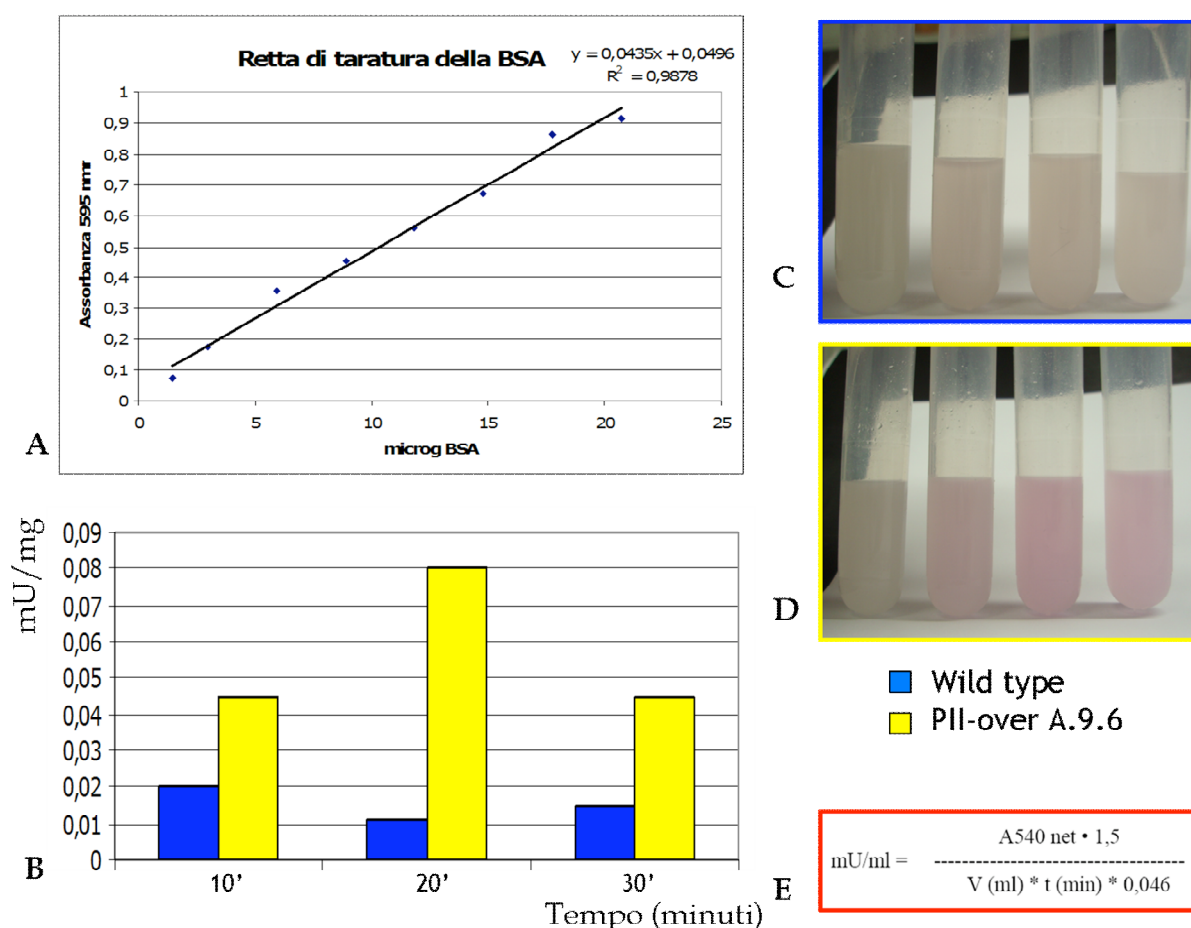


Figura 62: Effetto della *over*-espressione del gene *GLB1* in *L. japonicus* sull'attività dell'enzima nitrato riduttasi (NR). (A) Retta di taratura della BSA (albumina di siero bovino) utilizzata per la valutazione della concentrazione proteica mediante il metodo di Bradford. (B) Grafico ad istogrammi dell'attività specifica della nitrato riduttasi nelle foglie di piante *wild type* (barre azzurre) e *PII-over* A.9.6 (barre gialle). (C-D) Foto dei tubi in cui è avvenuto il saggio della nitrato riduttasi dopo 30' dall'inizio del saggio eseguito in piante *wild type* (contornate in azzurro) e *PII-over* A.9.6 (contornate in giallo). (E) Formula utilizzata per la valutazione dell'attività enzimatica degli estratti proteici.

5.9 Analisi dell'effetto della sensibilità al nitrito delle piante *over-esprimenti* il gene *GLB1* in *L. japonicus*

Come descritto nel capitolo dell' "Introduzione", studi effettuati su mutanti *knockout* inserzionali con T-DNA di *A. thaliana* [Ferrario-Mery *et al.* 2005] non hanno rilevato alcun fenotipo alterato nella crescita o nello sviluppo della pianta in condizioni *standard* di incubazione, mentre un forte fenotipo di crescita era osservato nei mutanti a determinate concentrazioni di nitrito nel mezzo se comparati alle piantine *wild type*. In particolare, si osservava una maggiore sensibilità al nitrito che si rifletteva in una ridotta crescita che era correlata alla concentrazione di nitrito nel mezzo. La tossicità al nitrito sembra essere correlata all'accumulo di nitrito nelle plantule; nei mutanti infatti è stato misurato un maggior accumulo di nitrito rispetto alle piante *wild type* cresciute nelle stesse condizioni (l'effetto era più pronunciato a 10 mM di nitrito per PIIS2 e 12.5 mM di nitrito per PIIV1) [Ferrario-Mery *et al.* 2005]. Sulla base di questi dati riportati in letteratura ci siamo chiesti se le piantine *over-esprimenti* il gene *GLB1* in *L. japonicus* rispondessero in maniera diversa rispetto alle piante *wild type* a diverse concentrazioni di nitrito nel mezzo di coltura. In un primo esperimento, semi di piante di *L. japonicus wild type* e *PII-over* A.9.6 sono state fatte germinare su acqua agar e successivamente trasferite su piastre contenenti concentrazioni crescenti di NaNO₂ (2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM), utilizzando come controllo piastre con 5 mM KNO₃. Analizzando vari parametri di crescita fra cui il peso fresco dello *shoot*, è stato possibile apprezzare un chiaro effetto sulla capacità di crescita delle piante all'aumentare della concentrazione di nitrito nel mezzo di crescita, ma non è stata rilevata nessuna differenza significativa tra le piante *wild type* e quelle *over-esprimenti* (Fig. 63A). In un secondo tipo di esperimento, è stato valutato l'effetto del nitrito sull'efficienza di germinazione e semi dei diversi genotipi sono stati fatti germinare direttamente sulle piastre con diverse concentrazioni di sodio nitrito, ma anche in questo caso non è stata rilevata nessuna differenza tra le piante *wild type* e *PII-over* A.9.6 (Fig. 63B-C). La percentuale di germinazione è la stessa del controllo (5 mM KNO₃) in piastre contenenti 2,5 mM NaNO₂, si riduce di circa la metà a 5 mM NaNO₂, si dimezza ancora ulteriormente a

7,5 mM NaNO_2 e diventa nulla a concentrazioni uguali o maggiori di 10 mM NaNO_2 (Fig. 63B). Anche la crescita successiva delle piante germinate dei due genotipi analizzati, è totalmente sovrapponibile in tutte le condizioni osservate (Fig. 63C).

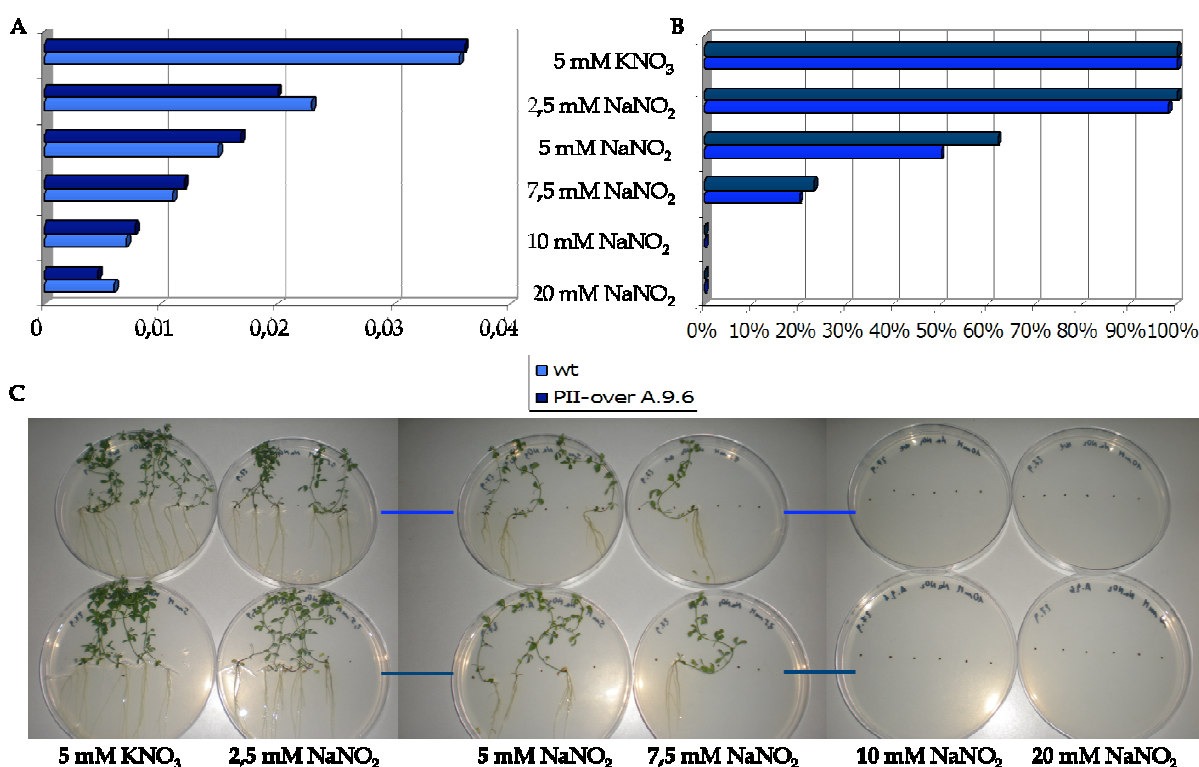


Figura 63: Analisi per valutare la sensibilità a concentrazioni crescenti di sodio nitrito (2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM, 10 mM e 20 mM) di piante di *L. japonicus* wild type (barre azzurre) e *PII-over* A.9.6 (barre blu). Come controllo sono state usate piastre con 5 mM KNO_3 . (A) Peso fresco dello shoot misurato in grammi al variare della concentrazione di sodio nitrito. (B) Percentuale di germinazione delle piante su diverse concentrazioni di sodio nitrito. (C) Foto delle piantine germinate su piastre contenenti diverse concentrazioni di sodio nitrito.

6. DISCUSSIONE

Le proteine PII fanno parte di una grande superfamiglia di proteine che agiscono come segnali di trasduzione e che sono ampiamente distribuite in natura. Queste proteine sono state studiate a lungo negli ultimi trenta anni ed è diventato sempre più evidente quanto esse giochino un ruolo fondamentale nel metabolismo dell'azoto delle cellule batteriche e nell'integrazione del metabolismo di C ed N anche nelle piante superiori [Uhrig *et al.* 2009]. Tali proteine formano una struttura omotrimerica capace di legarsi all'ATP ed al 2-ossoglutarato; questi effettori controllano il legame allosterico di PII a specifiche proteine *target*, che nelle piante superiori, sono enzimi chiave nel metabolismo di C ed N: l'NAGK (N-acetil-L-glutammato chinasi) e l'HtACCasi (Acetil-coenzima A carbossilasi eteromera). L'NAGK catalizza la reazione limitante del *pathway* di biosintesi dell'arginina ed il legame della proteina PII provoca l'attivazione di quest'enzima metabolico [Ferrario-Mary *et al.* 2006]. L'HtACCasi plastidiale è invece coinvolta nella formazione di malonil-CoA a partire da Acetil-CoA e bicarbonato, che è il maggior punto di controllo metabolico del *pathway* di biosintesi degli acidi grassi e l'interazione della proteina PII determina l'inibizione dell'attività dell'HtACCasi [Feria Bourrellier *et al.* 2010]. La proteina PII in pianta quindi rientra in questo complesso scenario metabolico modificando i *pathway* responsabili del rapporto tra C (acidi grassi)/N (aminoacidi) in relazione all'ambiente fisiologico. Durante la mia attività di Dottorato di Ricerca, condotto sotto la direzione scientifica del Dott. Maurizio Chiurazzi all'Istituto di Genetica e Biofisica "Adriano Buzzati Traverso" del CNR di Napoli, mi sono occupata della caratterizzazione funzionale della proteina PII nella leguminosa modello *L. japonicus*. *Lotus japonicus*, per le sue caratteristiche genotipiche e per il suo relativamente breve ciclo vitale, rappresenta un ottimo sistema modello (vedi paragrafo 2.1). Quest'analisi è stata effettuata anche alla luce del profilo spaziale di attività del promotore del gene *GLB1* (che codifica per la proteina PII) di *Lotus japonicus* [D'Apuzzo *et al.* manoscritto in preparazione], che suggerisce un ruolo specifico nei noduli azoto-fissatori e nelle aperture stomatiche delle foglie di *L. japonicus*, che al momento non è stato ancora ipotizzato nelle piante superiori (Fig. 48-49).

La caratterizzazione funzionale si è basata su un approccio di “*Reverse Genetic*” attraverso l’ottenimento di piante omozigoti di *L. japonicus* che *over-esprimessero* la proteina PII sotto il controllo del promotore costitutivo CAMV35S. L’analisi fenotipica ha rivelato un interessante e, fino ad ora non noto, coinvolgimento della proteina PII nel meccanismo di formazione dei noduli azoto-fissatori in risposta alla condizione azotata della pianta. Le piante leguminose infatti sono in grado di instaurare una simbiosi mutualistica con batteri del suolo appartenenti alla famiglia delle *Rhizobiaceae*, determinando sulle radici della pianta, la formazione, lo sviluppo ed il funzionamento dei noduli azoto-fissatori. La carenza nella disponibilità di azoto nel mezzo di crescita è un pre-requisito fondamentale per favorire l’innescò di questo processo; solo in queste condizioni infatti, un segnale secreto dalle cellule batteriche è percepito dai peli radicali della zona competente per la nodulazione sulla radice, e attraverso un complesso *pathway* di trasduzione del segnale, porta alla formazione del primordio nodulare [Oldroyd e Downie 2008]. In alcuni genotipi di *Medicago sativa*, la sola privazione di azoto è sufficiente ad indurre lo sviluppo di noduli privi di batteroidi ed è anche la condizione che determina lo sviluppo di noduli in mutanti di *Lotus japonicus* che fanno nodulazione spontanea [Tirichine *et al.* 2006]. Durante lo sviluppo degli studi di questa tesi di dottorato ho potuto osservare che le piante *over-esprimenti* la proteina PII sono in grado di formare più noduli in condizioni di crescita che normalmente determinano una riduzione della competenza in questo processo di organogenesi [Omrane *et al.* 2009]. In particolare, le piante *over-esprimenti* PII di *Lotus japonicus* pre-incubate per un periodo di 10 giorni su un substrato di coltura contenente elevate concentrazioni di fonti azotate (10 mM NH_4NO_3 , condizioni inibitorie per la nodulazione) e successivamente, trasferite su un terreno contenente 10 μM NH_4NO_3 ed infettate immediatamente con *Mesorhizobium loti* (Fig. 54A), esibivano una migliore capacità di nodulazione se confrontate con piante *wild type* trattate secondo lo stesso schema sperimentale. Nel caso delle *PII-over* la percentuale di piante incapaci di nodulare, quando pre-incubate in alto azoto, era ridottissima (8%), quando comparate con piante *wild type* (30% di piante incapaci di nodulare). Inoltre, il numero medio di noduli per pianta in quelle condizioni sperimentali, era circa il doppio di quello formato da piante *wild type* (Fig. 54). Le analisi effettuate suggeriscono che PII è presumibilmente coinvolto in un

meccanismo di *sensing* e/o trasduzione della condizione nutrizionale azotata della pianta che viene segnalata al macchinario preposto alla formazione del nodulo, piuttosto che al suo sviluppo e/o funzionamento. Nell'articolo di Omrane *et al.* (2009) si ipotizza che è la variazione della condizione nutrizionale azotata nelle piante pre-incubate in alto azoto rispetto a quelle pre-incubate in basso azoto, dipendentemente da processi di trasporto e assimilazione di questi nutrienti, ad essere responsabile della ridotta competenza per la nodulazione. Infatti, quest'ultima viene ri-acquisita nelle piante che, dopo essere state sottoposte alla pre-incubazione in alto azoto, vengono mantenute per almeno sei giorni in condizioni di basso azoto, in accordo con l'ipotesi che la condizione nutrizionale sistemica azotata della pianta è in grado di condizionarne la competenza per la capacità nodulante. Questo meccanismo è quindi diverso da quello che determina l'inibizione locale della organogenesi nodulare, determinato da elevate concentrazioni esterne di nitrato e/o ammonio, che interferiscono direttamente su alcuni passaggi precoci del *pathway* di trasduzione dei fattori Nod [Barbulova *et al.* 2007; Omrane e Chiurazzi 2009; Fig. 64].

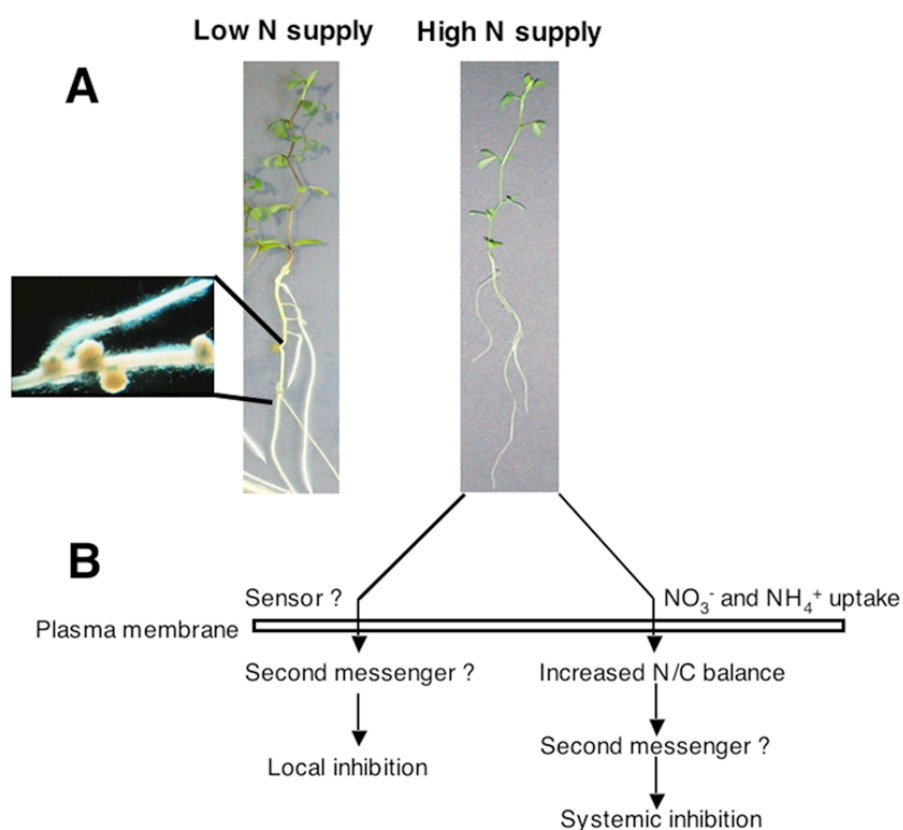


Fig. 64. *Pathway* di inibizione nodulare dipendente da elevate concentrazioni azotate. (A) Piante di *L. japonicus* cresciute in alto e basso azoto rispondono diversamente all'inoculazione con *M. loti*. (B) *Pathway* inibitori locali e sistemici associati ad un effetto dell'azoto esercitato in quanto segnale o nutriente.

In Omrane *et al.* (2009) è stata anche condotta un'analisi *affimetrix* per definire il profilo di espressione globale nelle piante di *L. japonicus* cresciute in alto (10 mM NH_4NO_3) e basso azoto (10 μM NH_4NO_3), identificando un certo numero di prodotti genici che rappresentano possibili candidati per la trasduzione del segnale legato alla condizione nutrizionale azotata sistemica della pianta ed al macchinario deputato al processo di organogenesi nodulare sulle radici. Fra i geni differenzialmente espressi nelle due condizioni (*up*- o *down*-regolati) non è stato riscontrato *LjGLB1* e questo è in accordo con l'analisi RT-PCR effettuata in questa tesi. Il gene *LjGLB1* presenta infatti lo stesso livello di espressione nelle radici di piante *wild type* cresciute su 10 μM NH_4NO_3 e 10 mM NH_4NO_3 , e quindi, l'eventuale coinvolgimento nel *pathway* di *signalling* che controlla la competenza alla nodulazione non viene esercitato attraverso un cambiamento del suo livello di espressione (Fig. 55). Questo risultato potrebbe suggerire che l'eventuale coinvolgimento della proteina PII sia associato a meccanismi di regolazione *post*-traduzionali a suo carico e/o di potenziali interattori proteici e questo, come ampiamente descritto nell'Introduzione di questa tesi, rappresenterebbe un meccanismo d'azione a cui questa proteina è largamente suscettibile.

Uno specifico coinvolgimento di PII nel meccanismo di formazione dei noduli è confermato dai risultati dei saggi di nodulazione e dalle osservazioni su sezioni di noduli mostrati in Figura 51-52 che non mostrano alcuna differenza sia a livello della ultrastruttura nodulare che a livello del funzionamento fra piante *wild type* e PII-*over* A.9.6. Infatti, il funzionamento dei noduli non era alterato: il peso fresco degli *shoot*, che riflette direttamente la capacità di riduzione dell'azoto atmosferico nei noduli ed il suo trasferimento sotto forma di ammonio al resto della pianta era mantenuto costante nei due genotipi analizzati (Fig. 51C). Dal punto di vista morfologico, le sezioni sottili ottenute al vibratomo indicavano una normale dimensione delle cellule invase ed un corretto rapporto numerico fra queste e le cellule non invase nei noduli di piante di *L. japonicus wild type* ed *over*-esprimenti il gene *LjGLB1* (Fig. 52). È infatti noto che noduli con deficienze nella capacità fissativa vanno incontro a senescenza precoce, che a livello ultrastrutturale si manifesta con un aumento della vacuolizzazione nelle cellule invase ed il fenomeno dell'autolisi. Anche l'analisi sulla localizzazione spaziale dell'attività GUS in sezioni longitudinali di noduli derivati

dall'infezione di piante della linea transgenica *prGLB1-gusA* con *M. loti wild type* e *nifH*⁻ ha consentito di verificare che il profilo di espressione del gene a livello del sistema vascolare e dell'*inner cortex* non varia in dipendenza della presenza di azoto ridotto nel nodulo (Fig. 53). Il batterio *M. loti nifH*⁻ infatti, è mutato nell'enzima dinitrogenasi reduttasi e quindi comporta la formazione di noduli non fissanti l'azoto (fenotipo Nod⁺, Fix⁻). Questi due ultimi risultati confermano quindi che PII non è presumibilmente coinvolto nel funzionamento del nodulo ma piuttosto in un *pathway* di *signalling* che determina a monte, il numero di noduli in maniera dipendente dalla condizione nutrizionale azotata della pianta.

Il successivo *step*, una volta evidenziato questo particolare fenotipo simbiotico delle piante *PII-over*, è quello di identificare il possibile *link* metabolico che può legare l'attività della proteina PII alla capacità nodulante in *L. japonicus*. A questo proposito, è stata effettuata un'ulteriore analisi sulle piante di *L. japonicus* per valutare la quantità di poliammine presenti in piante *PII-over* e *wild type*. Come già accennato nell'Introduzione, la putrescina e le altre poliammine spermina e spermidina, sono prodotte da due *pathway* alternativi nelle piante (Fig. 40). Uno di questi comincia con l'enzima arginina decarbossilasi (ADC), l'altro con l'ornitina decarbossilasi (ODC). I noduli radicali delle piante leguminose, accumulano poliammine a livelli che sono dalle 5 alle 10 volte più alti rispetto agli altri organi, sebbene la tipologia e la quantità di poliammine vari considerevolmente a seconda delle specie vegetali.

Analisi precedenti riportate in letteratura sul profilo dei metaboliti nei noduli azotofissatori di *L. japonicus* ottenute utilizzando la gas cromatografia e la spettrometria di massa, hanno rivelato un incremento da 2 a 6 volte nei livelli di putrescina nei noduli se comparati con gli altri organi [Flemetakis *et al.* 2004]. I geni coinvolti nella biosintesi delle poliammine identificati in *L. japonicus* sono tre *LjADC1* e *LjADC2* codificanti per l'enzima ADC e *LjODC* che codifica per l'ODC. Analisi di *Real Time* RT-PCR hanno mostrato che *LjADC1* e *LjADC2* sono espressi in tutti i tessuti vegetali, mentre *LjODC*, solo nei noduli e nelle radici [Flemetakis *et al.* 2004]. Inoltre, durante lo sviluppo dei noduli è stato osservato l'accumulo dei trascritti di questi geni che raggiungono un valore massimo 10 giorni dopo l'infezione con *M. loti*, quando si ha un incremento di 6,5 volte nei livelli di trascritti di *LjODC* e di due volte nei livelli di *LjADC1* e *LjADC2*, se comparati con le radici non infettate [Flemetakis *et*

al. 2004]. Negli stadi successivi dello sviluppo dei noduli, i trascritti di questi geni si riducono drasticamente per *LjADC* e più lentamente per *LjODC*. La localizzazione spaziale dei trascritti nel nodulo in via di sviluppo ha rivelato che entrambi questi geni sono espressi nelle cellule dell'*inner cortex* e nel tessuto centrale dei noduli; elevati livelli di trascritti di *LjADC1* sono stati osservati anche nel tessuto vascolare dei noduli e nelle radici, suggerendo che la putrescina e le altre poliammine in *L. japonicus* potrebbero essere soggette ad un trasporto a lunga distanza. Sembra quindi che le poliammine siano principalmente coinvolte nei processi fisiologici e cellulari che portano allo sviluppo del nodulo piuttosto che nei processi che riguardano direttamente la fissazione e l'assimilazione dell'azoto [Flemetakis *et al.* 2004], e questo ruolo potrebbe adattarsi bene con quello da noi ipotizzato per PII. Nel nostro caso in realtà non abbiamo osservato una variazione di putrescina nei noduli rispetto agli altri tessuti, probabilmente a causa del fatto che nel corso di questi esperimenti abbiamo analizzato solo la quantità di poliammine nei noduli maturi (a 4 settimane dall'infezione). Inoltre non ci sono sostanziali differenze nei livelli di spermina e spermidina nei noduli di piante *wild type* e *PII-over*, mentre c'è un sostanziale aumento nei livelli di citrullina ed una lieve riduzione nei livelli di putrescina nelle piante *over-esprimenti* il gene *LjGLB1* (Fig. 56). L'aumento di citrullina potrebbe essere direttamente spiegato da un incremento dell'accumulo di ornitina nelle piante *PII-over* (Fig. 65). Tale incremento porterebbe ad un aumento dell'arginina che rappresenta il substrato dell'enzima NO-sintasi, la cui esistenza nelle piante è ancora oggetto di dibattito (come vedremo più in dettaglio successivamente) e che a partire da questo aminoacido catalizza la formazione di NO e citrullina. Questa ipotesi sarebbe in accordo con i dati riportati in letteratura che indicano una riduzione di arginina, ornitina e citrullina nel mutante PII- di *A. thaliana* come conseguenza del coinvolgimento di questa proteina nel *pathway* biosintetico dell'arginina grazie alla sua capacità di interazione con la NAGK (Fig. 27) [Ferrario-Mery *et al.* 2006]. La riduzione di putrescina potrebbe invece essere imputabile ad un'eventuale azione della proteina PII sull'aumento della velocità della reazione catalizzata dall'ornitina transcarbamilasi (OTC); in questo caso una buona parte dell'ornitina prodotta verrebbe convertita più velocemente e con maggior efficienza in citrullina, portando

ad un aumento di questa poliammina con conseguente riduzione della putrescina (Fig. 65).

La lieve riduzione di putrescina potrebbe influenzare il processo di infezione che porta alla nodulazione. Infatti sebbene l'esatto ruolo delle poliammine durante il processo simbiotico non sia chiaro, sembra che i prodotti derivati dalla putrescina possano ritardare lo sviluppo del nodulo [Wisniewski e Brewin 2000]. Inoltre la putrescina è il substrato prediletto dell'enzima DAO (diamina ossidasi), che produce H_2O_2 ed è fondamentale per la biosintesi della lignina e le modifiche nella parete cellulare vegetale. È stato ipotizzato che il perossido d'idrogeno prodotto dall'attività dell'enzima DAO potrebbe promuovere il *cross-linking* tra le glicoproteine della matrice e quelle del *lumen* nei tubi di infezione, restringendo la crescita e lo sviluppo dei rizobi all'interno di queste strutture [Flemetakis *et al.* 2004].

Per quanto riguarda il forte incremento della citrullina nei noduli delle piante *over-esprimenti* (Fig. 56), questo è estremamente interessante se lo si rapporta ad un dato riportato abbastanza recentemente in letteratura in cui mutanti di *M. loti* nel gene codificante per la ornitina-carbamoyl-transferasi che partecipa alla biosintesi dell'arginina mostrano un fenotipo di nodulazione particolare [Mishima *et al.* 2008]. Questi mutanti *argF* infatti, formano le strutture di infezione (*infection thread*) ma sono difettivi nella capacità di invasione delle cellule corticali in cui si ritrovano pochi batteroidi. È estremamente interessante, alla luce dei nostri dati, che il fenotipo mutante di questi batteri, possa essere complementato oltre che dall'arginina, anche dalla citrullina aggiunta al mezzo di crescita delle piante. Questo indica un inatteso ruolo positivo della citrullina per il corretto svolgimento dell'organogenesi nodulare ed è in accordo con il dato da noi osservato in cui la maggiore capacità nodulante delle piante *PII-over* è associata ad un maggior accumulo di citrullina nei noduli (Fig. 65).

Infine è da notare che le poliammine sono state dimostrate essere oggetto di trasporto a lunga distanza (*long-distance transport*) attraverso le vie vascolari della pianta [Flemetakis *et al.* 2004] e quindi anche il cambiamento di concentrazione della spermina e della spermidina rilevato nelle foglie delle *PII-over* (Fig. 56) può essere collegato al fenotipo di nodulazione ottenuto (Fig. 65). Da questo punto di vista, la connessione da noi osservata fra concentrazione fogliare di alcune poliammine e

numero di noduli formato nelle *PII-over* è fortemente supportata da un'osservazione riportata in soia (*Glycine max*), in cui il contenuto fogliare di spermidina riscontrato nelle foglie delle piante *iper-nodulanti* (non soggette al meccanismo di autoregolazione descritto nell'Introduzione) è più basso che nelle piante *wild type* [Terakado *et al.* 2005]. In quello stesso articolo l'associazione fra contenuto di spermidina e numero di noduli era dimostrato da due esperimenti in cui il trattamento delle foglie di una pianta *wild type* con spermidina o un inibitore della biosintesi di questa, determinava rispettivamente una riduzione o un incremento del numero di noduli rispetto ai controlli non trattati [Terakado *et al.* 2005]. Uno dei prossimi obiettivi sarà quello di verificare quale delle attività anaboliche e/o cataboliche coinvolte nell'accumulo delle varie poliammine è alterato nelle piante di *Lotus japonicus over-esprimenti* la proteina PII. In particolare sarà esaminata l'espressione sia dei geni codificanti per gli enzimi coinvolti nelle vie anaboliche quali, OTC, ADC1, ADC2, SPMS, SPDS e sia di quelli codificanti per le amino-ossidasi coinvolti nelle vie cataboliche CuAOs (DAOs), PAOs (Fig. 57). In un secondo momento potranno anche essere messi a punto dei saggi in grado di valutare le diverse attività enzimatiche in estratti di piante *wild type* e *PII-over* allo scopo di definire un quadro completo dei possibili interattori allosterici della proteina PII. Un importante punto da sottolineare nella discussione del fenotipo nodulare osservato nelle piante *over-esprimenti* PII è legato alla localizzazione plastidiale di questa proteina (Fig. 23F; D'Apuzzo *et al.* Dati non pubblicati). Per quanto riguarda questo aspetto vanno ricordate le numerose evidenze che portano alla definizione dei plastidi come organelli cruciali per il corretto sviluppo e funzionamento dei noduli, in cui sono localizzati ad esempio enzimi chiave come quelli coinvolti nella sintesi di glutatione, che potrebbero giocare un ruolo importante nella protezione anti-ossidante e in reazioni di risposta a stress dei noduli [Moran *et al.* 2000] o come la GS plastidiale che è stata recentemente dimostrata essere coinvolta sia nel processo di formazione del nodulo che nel suo funzionamento [Calderon *et al.* 2011]. I possibili *cross-talk* fra i *pathway* delle poliammine e la funzione della proteina PII sono riassunti schematicamente nella Figura 65 e possono definire un coinvolgimento di quest'ultima nel controllo locale e/o sistemico delle concentrazioni di poliammine e

citrullina che a loro volta possono di per sé giustificare il fenotipo simbiotico riscontrato nelle piante *PII-over*.

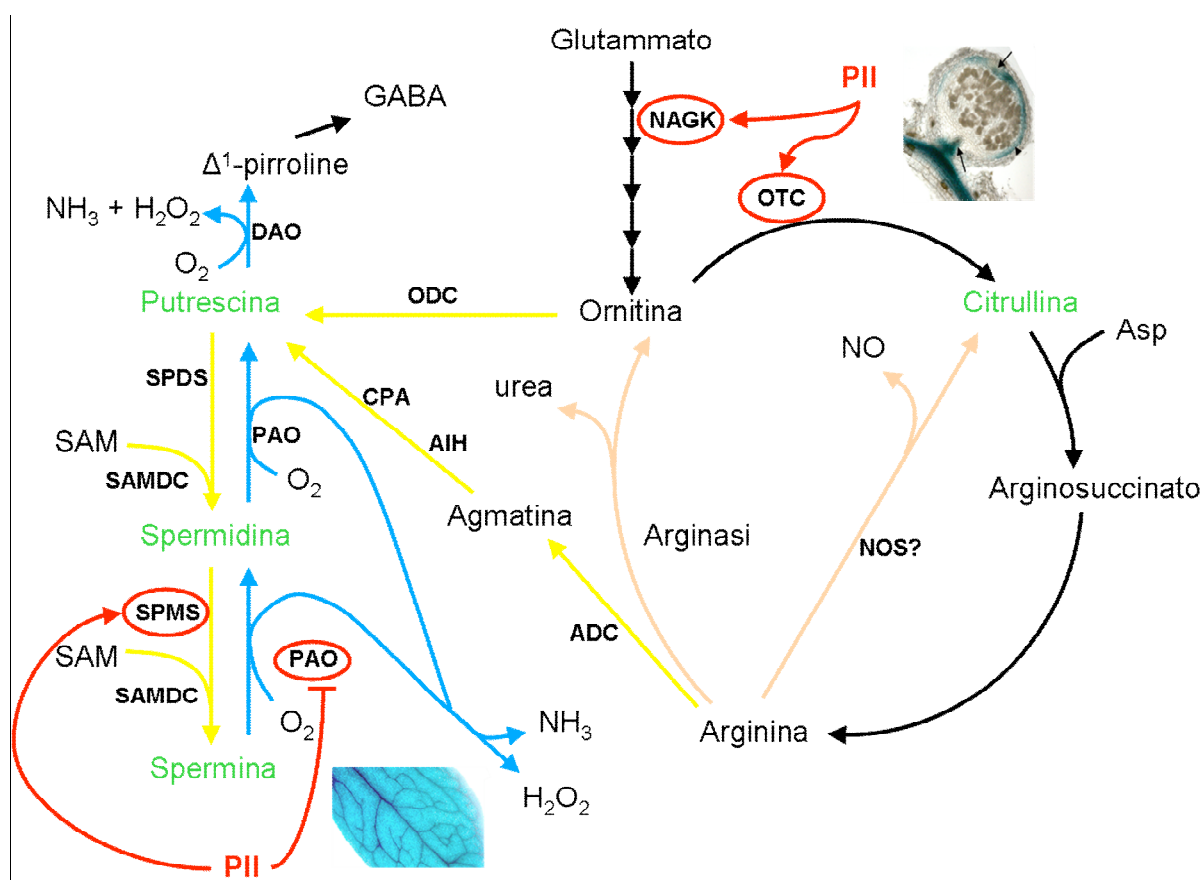


Figura 65: Modello del meccanismo di azione della proteina PII sulla biosintesi delle poliammine in *L. japonicus*. In verde sono evidenziate le molecole analizzate all'HPLC: le poliammine Putrescina, Spermidina e Spermina e l'aminoacido Citrullina. Le frecce gialle indicano le vie di biosintesi delle poliammine, mentre quelle in azzurro le vie di catabolismo. In rosso è indicata la proteina PII ed i suoi ipotetici punti di intervento nel tessuto nodulare e nelle foglie di *L. japonicus*. In nero è indicato il pathway di biosintesi dell'arginina a partire da glutammato. ADC: arginino-decarbossilasi; AIH: agmatina imminoidrossilasi; CPA: N-carbamoylputrescina amidoidrossilasi; DAO: Diammina ossidasi; NAGK: N-acetil glutammato chinasi; NOS: NO sintasi; ODC: ornitina decarbossilasi; OTC: Ornitina Transcarbamilasi; PAO: Poliammina ossidasi; SAMDC: S-adenosilmetionina decarbossilasi; SPMS: spermina sintasi; SPDS: spermidina sintasi.

Un analogo percorso è stato intrapreso anche per stabilire un *link* metabolico fra la funzione di PII ed il fenotipo stomatico osservato nelle piante *over-esprimenti*. Come descritto nel capitolo dei Risultati, il coinvolgimento della proteina PII nel meccanismo di apertura/chiusura degli stomi, è basato su numerose osservazioni fenotipiche. Parte di queste osservazioni sono state condotte durante il mio soggiorno nei laboratori del Prof. Alain Vavasseur del *Laboratoire des Echanges Membranaires et Signalisation*, all'*Institut de Biologie Végétale et Microbiologie*

Environnementales del CNRS/CEA/Université di Marsiglia. Nelle piante *over-esprimenti* è stata osservata costitutivamente una maggiore chiusura stomatica rispetto alle piante *wild type* (Fig. 58). Tale chiusura era riscontrata indipendentemente dalle condizioni di crescita e dall'aggiunta di ormoni, come l'acido abscissico (ABA), che normalmente controlla la cinetica del movimento stomatico. Numerosi sono i segnali endogeni o ambientali che influenzano la dimensione del poro dello stoma; questi fattori agiscono regolando il contenuto di acqua, o pressione di turgore, delle cellule di guardia. Come descritto nell'Introduzione (paragrafo 1.5.4), tra i fattori ambientali principali si possono annoverare la concentrazione di CO₂, la luce, la temperatura, l'umidità relativa e, naturalmente, la disponibilità di acqua nel suolo [Casson e Hetherington 2010]. Uno dei fattori endogeni più importanti e direttamente coinvolto nella regolazione del movimento stomatico è appunto l'acido abscissico (ABA). Questo ormone vegetale induce la chiusura stomatica sia quando è prodotto endogenamente, sia quando è fornito esogenamente nel suolo, applicato sullo stelo o iniettato nello xilema degli espianti attraverso un taglio alla base del picciolo [Wilkinson e Davies 2010]. *Vice versa*, la rimozione dell'ABA può interrompere questa sua attività anti-traspirante. Una volta arrivato alle cellule di guardia, l'ABA induce la chiusura stomatica innescando una serie di *pathway* di *signalling* a cui partecipano numerosi recettori e molecole segnale, tra cui l'NO ed il H₂O₂ [Neill *et al.* 2008]. Nel nostro caso le piante *PIL-over* rispondevano al trattamento con acido abscissico 10 µM nello stesso modo delle piante *wild type*, determinando una rapida ed efficiente chiusura degli stomi, la cui apertura passava da 3-3,5 nm a 1,5-2 nm (Fig. 58A). La stessa analisi è stata ripetuta, portando allo stesso risultato, anche con una più bassa concentrazione di ABA pari a 1 µM, perché basse concentrazioni avrebbero potuto evidenziare eventuali differenze che sarebbero potute essere annullate a concentrazioni più elevate (dati non mostrati). Questa mancata differenza nel grado di apertura del poro stomatico, era dovuta al pre-trattamento di 3 ore alla luce a cui ho sottoposto le epidermidi fogliari prima dell'aggiunta di ABA e che comportava la massima apertura di tutti gli stomi, annullando totalmente le differenze costitutive osservabili in piante non trattate. Infatti, in esperimenti successivi in cui steli uniformi di piantine *wild type* e *PIL-over* A.9.6 (con 3-4 trifoli a partire dagli apici) sono stati

prelevati dalle piante di *L. japonicus* di circa due mesi ed è stato tappato il sito di taglio con la colla per bloccare la perdita d'acqua attraverso i fasci vascolari, già al T₀ nelle epidermidi delle piante *PII-over* era rilevabile una maggiore chiusura stomatica e questa veniva mantenuta anche dopo 1 e 2 ore dal taglio (Fig. 58B). L'apertura stomatica media già al tempo 0 era di 3,5 nm per le epidermidi di foglie *wild type* e 2,5 nm per quelle *PII-over* (Fig. 58B). È da notare che le piante *PII-over* presentavano dopo 2 ore dall'inizio del trattamento di stress idrico, stomi ancora più chiusi (1-1,5 nm), di quelli osservati in seguito al trattamento con ABA (1-1,5 nm invece di 2-2,5 nm) (Fig. 58).

La maggiore chiusura stomatica costitutiva osservata nelle piante *PII-over* è stata trovata essere in accordo con una maggiore capacità di resistenza di queste piante a condizioni di stress idrico. Questo fenotipo è stato rivelato sia attraverso la misura della capacità di ritenzione dell'acqua che viene persa durante il processo di traspirazione (Fig. 59) e sia attraverso la misura del *Ratio Water Content* (RWC), il contenuto idrico relativo, che riflette la capacità della pianta di resistere a condizioni estreme di stress idrico (le piante non sono state annaffiate e sono state analizzate in un intervallo di tempo compreso tra 3-12 giorni; Fig. 60). Infatti apici uniformi di diverse piantine cresciute *in vivo*, prelevati e lasciati al buio dopo aver bloccato la perdita d'acqua attraverso i fasci vascolari con la colla, sono stati pesati su una bilancia analitica, ogni 10 minuti per 3 ore in modo da valutare la perdita d'acqua per traspirazione nel tempo. In tutti gli esperimenti eseguiti, le piante *PII-over*, traspiravano molto meno delle piante *wild type* (Fig. 59B) e questo fenomeno era molto ben visibile già ad occhio nudo alla fine delle 3 ore (Fig. 59A). Queste piante *over-esprimenti* avevano inoltre un contenuto idrico relativo (RWC) più alto rispetto alle *wild type*, già dopo 5 giorni di trattamento di stress idrico indotto interrompendo la distribuzione di acqua in piante cresciute *in vivo* (Fig. 60B). Dopo 12 giorni, la differente capacità delle piante analizzate di resistere a condizioni di stress idrico era molto chiara anche osservando i tipici sintomi di stress idrico presenti in modo molto più marcato nelle piante *wild type* piuttosto che nelle piante transgeniche *over-esprimenti*: rami più giovani incurvati, foglie avvizzite e di un colore verde pallido (Fig. 60A).

Entrambe queste analisi hanno chiaramente confermato la migliore capacità di risposta allo stress idrico di due linee transgeniche indipendenti *over*-esprimenti quando comparate con piante *wild type*. Allo scopo di identificare un possibile *link* fisiologico fra questi ultimi fenotipi descritti ed il ruolo della proteina PII, ho verificato se nelle piante *over*-esprimenti la proteina PII, ci fosse un'alterazione di qualcuno dei *pathway* metabolici che conducono alla sintesi di segnali importanti nel controllo del movimento stomatico.

Fra questi, vanno certamente considerati anche in questo caso quelli che portano alla sintesi di poliammine. Infatti, è noto che le poliammine influenzano l'apertura/chiusura stomatica ed alcuni autori hanno ipotizzato che esse mimino le condizioni di stress bloccando l'apertura degli stomi ed inducendone la chiusura [Liu *et al.* 2000]. Piante transgeniche di *A. thaliana* *over*-esprimenti il gene *ADC* con conseguente accumulo di putrescina, presentano un fenotipo di *drought resistance* [Alcazar *et al.* 2010]. Nel lavoro di Alcazar (2010) si discute anche del fatto che le poliammine potrebbero agire come segnali cellulari nell'intricata interazione con *pathway* di biosintesi degli ormoni vegetali, incluso l'acido abscissico (ABA) e recentemente è stata anche ipotizzata una via biosintetica diretta per la produzione di NO a partire dalle poliammine spermidina e spermina [Tun *et al.* 2006; Yamasaki e Cohen 2006]. Quindi, la differenza di concentrazione di poliammine riscontrata fra piante *wild type* e *PII-over*, potrebbe già rappresentare una possibile spiegazione per il fenotipo osservato nelle foglie delle piante *over*-esprimenti. In particolare, l'analisi sperimentale all'HPLC per il confronto delle quantità di poliammine nelle piante *PII-over* e *wild type*, ha rivelato un aumento della spermina e una quasi totale scomparsa della spermidina nelle foglie *PII-over* A.9.6 rispetto alle piante *wild type*, mentre i livelli di putrescina e citrullina restano costanti nelle foglie dei due genotipi analizzati (Fig. 56). Questo risultato potrebbe essere giustificato, come accennato precedentemente, da un eventuale coinvolgimento della proteina PII nei *pathway* anabolici e/o catabolici delle poliammine (Fig. 65). L'aumento di spermina nelle foglie, potrebbe essere legato al fenotipo chiusura degli stomi osservato e tale legame potrebbe passare attraverso un aumento dell'NO nelle foglie ad opera dell'attività enzimatica ipotizzata da dati recenti in letteratura (Fig. 66) [Tun *et al.* 2006; Yamasaki e Cohen 2006].

Non c'è dubbio che un fattore chiave nel controllo dei movimenti stomatici nelle cellule di guardia è rappresentato dall'ossido nitrico. L'NO è un importante molecola segnale endogena nelle cellule vegetali che media svariati processi fisiologici e di sviluppo [Wilkinson e Davies 2010] e la chiusura degli stomi indotta da ABA, avviene con la partecipazione di un complesso insieme di molecole segnale, tra cui si annovera anche l'ossido nitrico. Sono molteplici le evidenze che considerano inestricabilmente coinvolte queste due molecole: l'aggiunta di NO esogeno induce la chiusura stomatica, l'ABA promuove la produzione di NO, la rimozione di NO inibisce la chiusura stomatica in risposta all'ABA e la chiusura stomatica indotta da ABA è ridotta nei mutanti che sono incapaci di produrre NO [Neill *et al.* 2008]. L'NO agisce stimolando l'attività della MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) e la produzione di cGMP, entrambi richiesti per la chiusura degli stomi indotta da ABA [Neill *et al.* 2008].

A differenza di quanto avviene per gli animali, non sono ancora chiari i meccanismi che portano alla produzione di NO nelle piante [Lillo *et al.* 2004]. C'è un ampio *range* di potenziali enzimi che potrebbero generare NO, ma l'omologo dell'NO sintasi (NOS) che a partire dall'arginina porta alla formazione di NO e citrullina non è stato ancora identificato con certezza in pianta [Wilson *et al.* 2008]. Evidenze di attività NOS-like in pianta sono numerose [Guo *et al.* 2003; Wilson *et al.* 2008] ma in realtà, il potenziale gene ortologo codificante per un'enzima con un'attività simile a quella delle cellule di mammifero non è mai stato identificato nel regno vegetale. Si parla quindi in generale di una *nitric oxide-associated 1 activity* (NOA) che è stata riscontrata in diverse piante e con diverse localizzazioni nei vari compartimenti cellulari (Fig. 66). Al momento, l'ipotesi accettata è che gli enzimi NOA in pianta siano rappresentati da diverse subunità che concorrono alla formazione del macchinario redox richiesto per la sintesi di NO a partire da arginina e che possono interagire in particolari condizioni [Neill *et al.* 2008; Wilson *et al.* 2008]. Un altro enzima che sembra essere coinvolto nella produzione di NO è la NR [Wilson *et al.* 2008]. La precipua funzione della NR in pianta è quella di partecipare all'assimilazione dell'azoto nella reazione di conversione del nitrato in nitrito che avviene nel citosol delle cellule vegetali (Fig. 30A-B). Tuttavia, è stato dimostrato in soia, *A. thaliana* ed altre piante che la NR può convertire anche il nitrito in NO in una reazione

dipendente da NAD(P)H [Neill *et al.* 2008; Desikan *et al.* 2002]. L'identificazione dell'attività NR coinvolta direttamente nella produzione di NO si basa soprattutto sulla caratterizzazione fenotipica del doppio mutante *nia1-nia2* di *A. thaliana* che non sintetizza NO e non risponde all'ABA ed al nitrito come segnali di controllo dell'apertura stomatica [Dekisan *et al.* 2002].

Un altro enzima capace apparentemente di sintetizzare NO è stato identificato recentemente in radici di *A. thaliana* e indicato come *Nitrite:NO oxidoreductase* (NiNOR) [Neill *et al.* 2008]. Quest'enzima si lega alla membrana plasmatica, è radice-specifico e può generare NO, ma a differenza della NR non usa il NAD(P)H come cofattore, ma il citocromo C come donatore di elettroni ed il suo pH ottimale risulta essere più acido di quello della NR.

Infine, ci sono delle evidenze per cui in aggiunta alla produzione di NO catalizzata enzimaticamente a partire da nitrito e mediata dalla NR o NiNOR, questa molecola segnale può anche essere prodotta chimicamente dal nitrito mediante reazioni associate ai processi di trasporto degli elettroni nei mitocondri e nei cloroplasti. Inoltre, è stata dimostrata anche la produzione di NO sotto forma gassosa a partire da nitrito nell'apoplasto dello strato aleuronico del seme di orzo [Jasid *et al.* 2006; Bethke *et al.* 2004]. Al momento, è in corso un'analisi diretta del contenuto in NO nelle piante *PII-over* e *wild type* mediante l'utilizzazione del marcatore fluorescente 4,5-diaminofluoresceina-2-diacetato (DAF-2-DA) che è normalmente usato per la rilevazione dell'NO in tessuti animali e di pianta, a causa della sua capacità di permeabilizzare le membrane ed interagire con l'NO rilasciando il prodotto fluorescente DAF-2 triazolo. In quest'ottica, risulta comunque già di grande interesse l'osservazione fatta su estratti proteici di foglia che mostrano un forte aumento dell'attività nitrato riduttasica nelle piante *PII-over* rispetto alle piante *wild type* (Fig. 62). Quest'ultimo dato suggerisce che la proteina PII interviene nella regolazione del *pathway* metabolico che a partire dal nitrato porta alla sintesi di NO, agendo sulla regolazione dell'enzima NR (Fig. 66). L'aumento dell'attività della NR potrebbe regolare l'accumulo dell'NO in diversi modi: i) attraverso la reazione che porta alla riduzione del nitrito utilizzando il NAD(P)H come donatore di elettroni; ii) attraverso la reazione catalizzata dalla NiNOR che è coordinata dall'attività NR associata alla membrana plasmatica e che riduce il nitrato a nitrito; iii) attraverso la

produzione chimica di NO a partire dal nitrito nelle reazioni non catalizzate enzimaticamente. Fra queste tre possibilità, la seconda risulta essere la più improbabile visto che la presenza dell'attività NR/NO riduttasi è stata esclusivamente trovata in estratti di radice ed appare quindi strano che possa essere associata ad una funzione regolativa che avviene nelle cellule di guardia delle foglie. Per quanto riguarda l'attività nitrato riduttasica che porta alla formazione del nitrito, questa è topologicamente associata ai plastidi, in quanto il nitrito prodotto viene trasportato all'interno dei cloroplasti, dove viene ulteriormente ridotto ad opera della nitrito riduttasi nei *pathway* di assimilazione dell'azoto. In particolare, in *A. thaliana* è stato dimostrato che la gran parte dell'attività NR coinvolta nella produzione di NO nelle cellule di guardia dipende dal gene *NIA1* [Bright *et al.* 2006] che sembra ricoprire in quel contesto cellulare un'azione piuttosto specifica, diretta verso la sintesi di NO. Questa topologia è perfettamente consistente con il profilo di espressione spaziale rilevato dall'analisi delle fusioni *gusA* in *L. japonicus* e mostrate nelle Figure 48-49. La stessa compatibilità di funzione vale per la localizzazione della proteina PII che, pur essendo codificata dal genoma nucleare, è traslocata sui plastidi come confermato anche da analisi con microscopia confocale a fluorescenza sulla proteina PII di *L. japonicus* (Fig. 23F) [D'Apuzzo *et al.* Dati non pubblicati]. Anche l'ipotesi che l'aumento dell'attività NR associata all'*over*-espressione di PII, conduca ad un aumento dell'accumulo di NO attraverso un incremento della concentrazione di nitrito (substrato utile per la produzione chimica di ossido nitrico), potrebbe comunque essere presa in considerazione visto che talora questo processo di sintesi è stato associato ai cloroplasti, mentre nel caso della produzione di NO rilevata nello spazio apoplastico, questo prevedrebbe il successivo *uptake* dell'NO all'interno delle cellule di guardia.

Al momento siamo indirizzati prima di tutto verso la caratterizzazione dell'attività NR anche nella seconda linea *over*-esprimente PII per confermare il dato ottenuto con la linea A.9-6. Successivamente, sarà interessante investigare se tale incremento passi attraverso un'induzione dell'espressione del/i gene/i codificante/i per la nitrato riduttasi o attraverso una modifica *post*-traduzionale di quest'ultima la cui attività è nota essere fortemente condizionata da una reazione di fosforilazione (paragrafo 1.4.2; Fig. 30E).

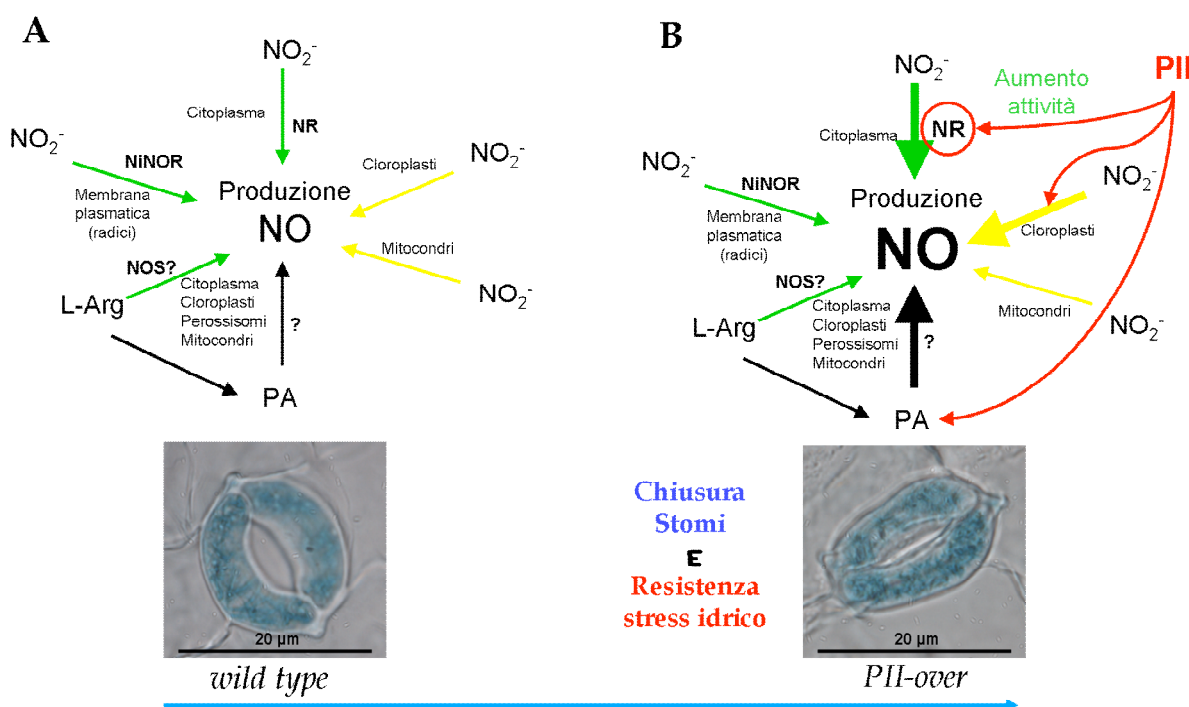


Figura 66: Vie biosintetiche per la produzione di NO nelle cellule vegetali e possibile coinvolgimento di PII. (A) *Pathway* biosintetici per la produzione di NO. Le reazioni catalizzate enzimaticamente sono indicate con le frecce in verde; quelle che procedono chimicamente sono indicate in giallo. Modificata da Wilson *et al.* 2008. (B) Modello schematico del meccanismo di azione della proteina PII sul processo di regolazione di apertura/chiusura degli stomi in *L. japonicus*. PII può influenzare l'attività NR e la concentrazione di poliammine nelle foglie. L'effetto sul movimento stomatico con la conseguente maggiore resistenza a condizioni di stress idrico sono rappresentate nelle foto raffiguranti cellule di guardia di piante *wild type* e *PII-over*. NR: nitrato reduttasi; NOS: Ossido nitrico sintasi; NiNOR: Nitrito-NO ossido riduttasi; PA: poliammine.




Per rendere il quadro del coinvolgimento e delle possibili sovrapposizioni del ruolo di PII nel *network* di *pathway* metabolici che influenzano processi come la nodulazione e la chiusura stomatica, ancora più complicato ma allo stesso tempo affascinante, va aggiunto il ruolo esercitato dall'NO anche nell'organogenesi del nodulo azoto-fissatore. Come accennato precedentemente, l'NO è una fondamentale molecola segnale che controlla un vastissimo raggio di processi fisiologici e di sviluppo nelle piante. È infatti coinvolto nella risposta di difesa a patogeni, nella fioritura, nella quiescenza dei semi, nella crescita del tubetto pollinico, nell'organogenesi radicale, così come nella modulazione dell'espressione genica e nelle modifiche *post-traduzionali*. Non stupisce quindi il fatto che una molecola con un così ampio spettro di azione sia coinvolto anche nel processo di nodulazione. Innanzitutto, la presenza di NO è stata rilevata nelle strutture di infezione (*infection thread*) e nei primordi nodulari [Del Giudice *et al.* 2011]. La riduzione di NO causata

dall'agente 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO) somministrato a piante di *Medicago truncatula*, così come la *over*-espressione del gene batterico *hmp* (codificante una *flavo-haemoglobin*), capace di ridurre l'accumulo di NO in radici transgeniche, determinano un significativo ritardo e difetto nel processo di nodulazione in seguito ad inoculazione con *R. meliloti*. Questo fenotipo di nodulazione è associato alla *down*-regolazione di geni di pianta coinvolti nello sviluppo del nodulo [Del Giudice *et al.* 2011]. È plausibile quindi immaginare una radice comune dei fenotipi legati all'*over*-espressione di PII sulla base del suo possibile coinvolgimento nel controllo della sintesi dell'NO, una molecola in grado di regolare sia il processo di nodulazione che quello della chiusura stomatica nelle cellule di guardia.

In conclusione, sulla base dei dati prodotti, abbiamo dimostrato il coinvolgimento della proteina PII della leguminosa modello *L. japonicus*, da un lato nel *sensing* e/o *pathway* di *signalling* che portano allo sviluppo del nodulo azoto-fissatore e dall'altro, nella chiusura stomatica delle cellule di guardia. In particolare, l'*over*-espressione della proteina PII determina dei vantaggi in termini di efficienza di risposta in determinate condizioni ambientali. Le piante *over*-esprimenti infatti, sono in grado di nodulare meglio in condizioni di eccesso di azoto, che normalmente inibiscono tale processo di organogenesi, e di resistere meglio a condizioni di stress idrico. Mentre nel secondo caso il vantaggio legato alla migliore capacità di risposta a condizioni avverse è chiaro, nel primo non c'è un ovvio vantaggio come dimostrato anche dalla identica efficienza di crescita delle piante *wild type* e *PII-over* (il peso fresco non cambia, Fig. 51C). Anche in quest'ultimo caso però, non va escluso un possibile vantaggio competitivo in condizioni diverse da quelle *in vitro* utilizzate in laboratorio, come nella rizosfera, in cui la maggiore competenza a nodulare potrebbe comunque risultare molto più importante. Certamente questo insieme di dati sta contribuendo e presumibilmente contribuirà in futuro a delineare ulteriori raggi di azione per la proteina PII di pianta, in accordo con la diversificazione funzionale già indicata dagli attuali dati di letteratura che comunque ne identificano un ruolo chiave come integratore dei livelli cellulari di C, N ed energia [Baud *et al.* 2010; Feria Bourrellier *et al.* 2010; Ferrario-Mary *et al.* 2008; Uhrig *et al.* 2009].

■ BIBLIOGRAFIA

A

-  Adler SP, Purich D, Stadtman ER (1975). *Cascade control of Escherichia coli glutamine synthetase: properties of the PII regulatory protein and the uridylyltransferase-uridylylremoving enzyme*. J. Biol. Chem, 250:6264–6272.
-  Alcazar R, Altabella T, Marco F, Bortolotti C, Reymond M, Koncz C, Carrasco P, Tiburcio AF (2010). *Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance*. Planta, 231:1237–1249.
-  Arcondéguy T, Jack R, Merrick M (2001). *pII Signal Transduction proteins, pivotal players in microbial nitrose control*. Microbiol Mol Biol Rev, 65 (1):80-105.

B

-  Banba M, Siddique AB, Kouchi H, Izui K, Hata S (2001). *Lotus japonicus forms early senescent root nodules with Rhizobium etli*. MPMI, 14:173-180.
-  Barbulova A, D'Apuzzo E, Rogato A, Chiurazzi M (2005). *Improved procedures for in vitro regeneration and for phenotypic analysis in the model legume Lotus japonicus*. Functional Plant Biology, 32:529-536.
-  Barbulova A, , Rogato A, D'Apuzzo E, Omrane S, Chiurazzi M (2007). *Differential effects of combined N sources on early steps of the Nod factor-dependent transduction pathway in Lotus japonicus*. Mol Plant–Microbe Interact, 20:994–1003.
-  Baud S, Feria Bourrellier AB, Azzopardi M, Berger A, Dechorgnat J, Vedele FD, Lepiniec L, Miquel M, Rochat C, Hodges M, Ferrario-Mary S (2010). *PII is induced by WRINKLED1 and fine-tunes fatty acid composition in seeds of Arabidopsis thaliana*. Plant Journal, 64:291-303.
-  Beez S, Fokina O, Herrmann C, Forchhammer K (2009). *N-Acetyl-L-Glutamate kinase (NAGK) from oxygenic phototrophs: P(II) signal transduction across domains of life reveals novel insights in NAGK control*. J. Mol. Biol, 389:748–758.
-  Bethke PC, Badger MR, Jones RL (2004). *Apoplasmic synthesis of nitric oxide by plant tissues*. The Plant Cell, 16:332-341.
-  Bisseling T, van den Bos RC, van Kammen A (1978). *The effect of ammonium nitrate on the synthesis of nitrogenase and the concentration of leghemoglobin in pea root nodules induced by Rhizobium leguminosarum*. Biochim Biophys Acta, 539:1-11.
-  Bright J, Desikan R, Hancock JT, Weir IS, Neill SJ (2006). *ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis*. The Plant J, 45:113-122.
-  Brown J (2003). *Ancient horizontal gene transfer*. Nat Rev Genet, 4:121–132.
-  Burillo S, Luque I, Fuentes I, Contreras A (2004). *Interactions between the nitrogen signal transduction protein PII and NAcetyl Glutamate kinase in organisms that perform oxygenic photosynthesis*. J Bact, 186:3346–3354.

C

- 🦋 Calderon MG, Chiurazzi M, Espuny MR, Marquez AJ (2011). *Photorespiratory metabolism and nodule function: behaviour of mutants deficient in plastid glutamine synthetase from Lotus japonicus*. Mol Plant Microbe Inter, In press.
- 🦋 Casson SA, Hetherington AM (2010) *Environmental regulation of stomatal development*. Plant Biol, 13:90-95.
- 🦋 Chen YM, Ferrar TS, Lohmeier-Vogel EM, Morrice N, Mizuno Y, Berenger B, Ng KK, Muench DG, Moorhead GB (2006). *The PII signal transduction protein of Arabidopsis thaliana forms an arginine-regulated complex with plastid N-acetyl glutamate kinase*. J. Biol. Chem., 281:5726–5733.
- 🦋 Conroy MJ, Durand A, Lupo D, Li XD, Bullough PA, Winkler FK, Merrick M (2007). *The crystal structure of the Escherichia coli AmtB-GlnK complex reveals how GlnK regulates the ammonia channel*. PNAS, 104 (4):1213-1218.
- 🦋 Cordoba E, Shishkova S, Vance CP, Hernandez G (2003). *Antisense inhibition of NADH glutamate synthase impairs carbon/nitrogen assimilation in nodules of alfalfa*. The Plant J, 33:1037-1049.

D









- 🦋 Del Giudice J, Cam Y, Damiani I, Fung-Chat F, Meilhoc E, Bruand C, Brouquisse R, Puppò A, Boscari A (2011). *Nitric oxide is required for an optimal establishment of the Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti symbiosis*. New Phytol, 191:405-417.
- 🦋 Desikan R, Criffiths R, Hancock J, Neill S (2002). *A new role for an old enzyme: Nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in Arabidopsis thaliana*. PNAS, 99(25):16314-16318.
- 🦋 Diaz P, Borsani O, Monza J (2005). *Lotus-related species and their agronomic importance*. Da Lotus japonicus Handbook, Springer edizioni, Capitolo 1.2.
- 🦋 Diaz P, Betti M, Sanchez DH, Udvardi MK, Monza J, Marquez AJ (2010). *Deficiency in plastidic glutamine synthetase alters proline metabolism and transcriptomic response in Lotus japonicus under drought stress*. New Phytol, 188:1001-1013.
- 🦋 Dodsworth JA, Leigh JA (2007). *Nifl inhibits nitrogenase by competing with Fe protein for binding to the MoFe protein*. Biochem Biophys Res Commun, 364:378-382.

E





- 🦋 Efrose RC, Flemetakis E, Sfichi L, Stedel C, Kouri ED, Udvardi MK, Kotzabasis K, Katinakis P (2008). *Characterization of spermidine and spermine synthases in Lotus japonicus: induction and spatial organization of polyamine biosynthesis in nitrogen fixing nodules*. Planta, 228(1):37-49.

F


- 🦋 Feria Bourrellier AB, Valot B, Guillot A, Ambard-Bretteville F, Vidal J, Hodges M (2010). *Chloroplast acetyl-CoA carboxylase activity is 2-oxoglutarate-regulated by interaction of PII with the biotin carboxyl carrier subunit*. PNAS, 107(1):502-507.

-  Ferrario-Mery S, Bouvet M, Leleu O, Savino G, Hodges M, Meyer C (2005). *Physiological characterisation of Arabidopsis mutants affected in the expression of the putative regulatory protein PII*. *Planta*, 223:28–39
-  Ferrario-Mery S, Besin E, Pichon O, Meyer C, Hodges M (2006). *The regulatory PII protein controls arginine biosynthesis in Arabidopsis*. *FEBS Lett*, 580:2015–2020.
-  Ferrario-Mery S, Meyer C, Hodges M (2008). *Chloroplast nitrite uptake is enhanced in Arabidopsis PII mutants*. *FEBS Lett*, 582:1061–1066.
-  Flemetakis E, Efrose RC, Desbrosses G, Dimou M, Delis C, Aivalakis G, Udvardi MK, Katinakis P (2004). *Induction and spatial organization of polyamine biosynthesis during nodule development in Lotus japonicus*. *MPMI*, 17:1283–1293.
-  Fokina O, Chellamuthu VR, Forchhammer K, Zeth K (2010). *Mechanism of 2-oxoglutarate signaling by the Synechococcus elongatus pII signal transduction protein*. *PNAS*, 107(46):19760–19765.
-  Foor F, Reuveny Z, Magasanik B (1980). *Regulation of the synthesis of glutamine synthetase by the PII protein in Klebsiella aerogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 77:2636–2640.
-  Forchhammer K (2008). *PII signal transducers: novel functional and structural insights*. *Trends microbial*, 16:65–72.
-  Forchhammer K (2004). *Global carbon/nitrogen control by PII signal transduction in cyanobacteria: from signals to targets*. *FEMS Microbiol Rev*, 28:319–333.


G

-  Garufi A (2008). *Interazione tra le proteine 14.3.3 e l'H⁺-ATPasi di membrana plasmatica: ruolo delle poliammine e via di trasduzione indotta dagli zuccheri*. Tesi di Dottorato. Università degli Studi di Roma “Tor Vergata”.
-  Gogarten JP, Townsend JP (2005). *Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution*. *Nat Rev Microbiol*, 3(9):679–687.
-  Gordon AJ, Minchin FR, James CL, Komina O (1999). *Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation*. *Plant Physiol*, 120:867–877.
-  Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM (2003). *Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling*. *Science*, 302:100–103.



H

-  Hsieh MH, Lam HM, Van De Loo FJ, Coruzzi G (1998). *A PII-like protein in Arabidopsis: putative role in nitrogen sensing*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:13965–13970.








J

-  Jasid S, Simontacchi M, Bartoli CG, Puntarulo S (2006). *Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins*. *Plant Physiol*, 142:1246–1255.




K






-  Kloft N, Rasch G, Forchhammer K (2005). *Protein phosphatase PphA from Synechocystis sp. PCC 6803: the physiological framework of pII-P dephosphorylation*. Microbiol, 151:1275-1283.
-  Krussell L, Krause K, Ott T, Desbrosses G, Kramer U, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, James EK, Sandal N, Stougaard J, Kawaguchi M, Miyamoto A, Suganuma N, Udvardi MK (2005). *The sulfate transporter SST1 is crucial for symbiotic nitrogen fixation in Lotus japonicus root nodules*. The Plant Cell, 17:1625-1636.

L





-  Lawson T, James W, Weyers J (1998). *A surrogate measure of stomatal aperture*. J Exper Bot, 49(325):1397-1403.
-  Leonhardt N, Kwak JM, Robert N, Waner D, Leonhardt G, Schroeder JI (2004). *Microarray expression analyses of Arabidopsis guard cells and isolation of a recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant*. The Plant Cell, 16:596-615.
-  Lillo C, Meyer C, Lea US, Provan F, Olteidal S (2004). *Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase*. J Exp Bot, 55:1275-1282.
-  Little R, Colombo V, Leech A, Dixon R (2002). *Direct interaction of the NifL regulatory protein with the GlnK signal transducer enables the Azotobacter vinelandii NifL-NifA regulatory system to respond to conditions replete for nitrogen*. J Biol Chem, 277:15472-15481.
-  Liu K, Fu H, Bei Q, Luan S (2000). *Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements*. Plant Physiol, 124:1315-1325.
-  Llacer JL, Contreras A, Forchhammer K, Marco-Marin C, Gil-Ortiz F, Maldonado R, Fita I, Rubio V (2007). *The crystal structure of the complex of pII and acetylglutamate kinase reveals how pII controls the storage of nitrose as arginine*. PNAS, 104(45):17644-17649.
-  Lombardi P, Ercolano E, El Alaoui H, Chiurazzi M. (2003). *A new transformation-regeneration procedure in the model legume Lotus japonicus. Root explants as a source of large number of cells susceptible to Agrobacterium mediated transformation*. Plant Cell Report, 21:771-777.

M





-  Marquez AJ, Betti M, Garcia-Calderon M, Estivill G, Credali A, Pajuelo P, Orea A, Clemente MT, Pajuelo E, Galvan F (2005). *Nitrate and ammonium assimilatory enzymes*. Da Lotus japonicus Handbook, Springer edizioni, Capitolo 7.2.
-  Merrick M J, Edwards RA (1995). *Nitrogen control in bacteria*. Microbiol Rev, 59:604-622.
-  Mishima E, Hosokawa A, Imaizumi-Anraku H, Saito K, Kawaguchi M, Saeki K (2008). *Requirement for Mesorhizobium loti ornithine transcarbamoylase for successful symbiosis with Lotus japonicus as revealed by an unexpected long-range genome deletion*. Plant Cell Physiol, 49(3):301-313.

-  Mizuno Y, Berenger B, Moorhead GBG, Kenneth KS (2007)a. *Crystal structure of Arabidopsis PII reveals novel structural elements unique to plants*. Biochem, 46:1477-1483.
-  Mizuno Y, Moorhead GBG, Kenneth KS (2007)b. *Structural basis for the regulation of N-Acetylglutamate Kinase by PII in Arabidopsis thaliana*. J Biol Chem, 282(49):35733-35740.
-  Moorhead GBG, Smith CS (2003). *Interpreting the plastid carbon, nitrogen, and energy status. A role for PII?* Plant Physiol, 133:1-7.
-  Moran JF, Ormaetxe II, Matamoros MA, Rubio MC, Clemente MR, Brewin NJ, Becana M (2000). *Glutathione and homoglutathione synthetases of legume nodules. Cloning, expression, and subcellular localization*. Plant Physiol, 124:1381-1392.
-  Muro-Pastor AM, Valladares A, Flores E, Herrero A (2002). *Mutual dependence of the expression of the cell differentiation regulatory protein HetR and the global nitrogen regulator NtcA during heterocyst development*. Mol Microbiol, 44:1377-1385.







N

-  Nakamura Y, Kaneko T, Sato S, Mimuro M, Miyashita H, Tsuchiya T, Sasamoto S, Watanabe A, Kawashima K, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Nakazaki N, Shimpo S, Takeuchi C, Yamada M, Tabata S (2003). *Complete genome structure of Gloeobacter violaceus PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids*. DNA Res, 10(4):137-45.
-  Neill S, Barros R, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Morris P, Ribeiro D, Wilson I (2008). *Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress*. J Exp Botany, 59(2):165-176.
-  Nelson DL, Cox MM (2002). *I principi di biochimica di Lehninger*, 3^a ed. Zanichelli editore, Bologna, Capitoli 21-22.
-  Nomura M, Mai HT, Fujii M, Hata S, Izui K, Tajima S (2006) *Phosphoenolpyruvate carboxylase plays a crucial role in limiting nitrogen fixation in Lotus japonicus nodules*. Plant Cell Physiol, 47:613-621.




O

-  Oldroyd GED, Downie JA (2004). *Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes*. Nat Reviews-Mol Cell Biol, 5:566-576.
-  Oldroyd GED, Downie JA (2008). *Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes*. Ann Rev Plant Biol, 59:519-546.
-  Omrane S, Ferrarini A, D'Apuzzo E, Rogato A, Delledonne M, Chiurazzi M (2009). *Symbiotic competence in Lotus japonicus is affected by plant nitrogen status: transcriptomic identification of genes affected by a new signalling pathway*. New Phytol, 183:380-394.
-  Osanai T, Tanaka K (2007). *Keeping in touch with PII: PII-interacting proteins in unicellular cyanobacteria*. Plant Cell Physiol, 48:908-914





P

-  Pajuelo E, Stougaard J (2005). *Lotus japonicus as a model system*. Da *Lotus japonicus Handbook*, Springer edizioni, Capitolo 1.1.
-  Pawlowski A, Riedel KU, Klipp W, Dreiskemper P, Groß S, Bierhoff H, Drepper T, Masepohl B (2003). *Yeast twohybrid studies on interaction of proteins involved in regulation of nitrogen fixation in the phototrophic bacterium Rhodobacter capsulatus*. J Bacteriol, 185:5240–5247.
-  Peng J, Huang CH (2006). *Rh proteins vs. Amt proteins: an organismal and phylogenetic perspective on CO₂ and NH₃ gas channels*. Transfus Clin Biol, 13:85–94.
-  Perfus-Barbeoch L, Leonhardt N, Vavasseur A, Forestier C (2002). *Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status*. Plant J, 32:539-548.
-  Plesch G, Ehrhardt T, Mueller-Roeber M (2001). *Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression*. The Plant J, 28(4):455-464.
-  Prival MJ, Brenchley JE, Magasanik B (1973). *Glutamine synthetase and the regulation of histidase formation in Klebsiella aerogenes*. J. Biol. Chem, 248:4334–4344.

R

-  Ramellini P (2009). *Vivere insieme - organismi e simbiosi*. IF Press, Roma, Capitoli 3, 4, 7.
-  Raven JA, Allen JF (2003). *Genomics and chloroplast evolution: what did cyanobacteria do for plants?* Genome Biol 4:209
-  Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE (2002). *Biologia delle piante*. 6^a ed. Zanichelli editore, Bologna, Capitoli 27-31.

S

-  Sanders CE, Melis A e Allen JF (1989). *In vivo phosphorylation of proteins in the cyanobacterium Synechococcus 6301 after chromatic acclimation to Photosystem I or Photosystem II light*. Biochim Biophys Acta, 976:168–172.
-  Sant'Anna FH, Trentini DB, Weber SS, Cecagno R, da Silva SC, Schrank IS (2009). *The pII superfamiliy revised: a novel group and evolutionary insights*. J Mol Evol, 68:322-336.
-  Sasaki Y, Nagano Y (2004). *Plant acetyl-CoA carboxylase: Structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding*. Biosci Biotechnol Biochem, 68 (6):1175–1184.
-  Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Asamizu E, Kato T, Nakao M, Sasamoto S, Watanabe A, Ono A, Kawashima K, Fujishiro T, Katoh M, Kohara M, Kishida Y, Minami C, Nakayama S, Nakazaki N, Shimizu Y, Shinpo S, Takahashi C, Wada T, Tamada M, Ohmido N, Hayashi M, Fukui K, Baba T, Nakamichi T, Mori H, Tabata S (2008). *Genome structure of the legume, Lotus japonicus*. DNA Res, 15(4):227-239.

- 🦋 Shapiro BM (1969). *The glutamine synthetase deadenylylating enzyme system from Escherichia coli: resolution into two components, specific nucleotide stimulation, and cofactor requirements*. Biochemistry, 8:659-670.
- 🦋 Smith CS, Morrice NA, Moorhead GBG (2004). *Lack of evidence for phosphorylation of Arabidopsis thaliana PII: implications for plastid carbon and nitrogen signaling*. Biochim Biophys Acta, 1699:145-154.
- 🦋 Smith CS, Weljie AM, Moorhead GBG (2003). *Molecular properties of the putative nitrogen sensor PII from Arabidopsis thaliana*. Plant J, 33:353-360.
- 🦋 Streeter J (1988). *Inhibition of legume formation and N₂ fixation by nitrate*. Crit Rev Plant Sci, 7:1-23.
- 🦋 Suganuma N, Nakamura Y, Yamamoto M, Ohta T, Koiwa H, Akao S, Kawaguchi M (2003). *The Lotus japonicus Sen1 gene controls rhizobial differentiation into nitrogen-fixing bacteroids in nodules*. Mol Gen Genom, 269:312-320.
- 🦋 Sugiura M, Georgescu MN, Takahashi M (2007). *A nitrite transporter associated with nitrite uptake by higher plant chloroplasts*. Plant Cell Physiol, 48:1022-1035.
- 🦋 Sugiyama K, Hayakawa T, Kudo T, Ito T, Yamaya T (2004). *Interaction of N-acetylglutamate kinase with a PII-like protein in rice*. Plant Cell Physiol, 45:1768-1778




T

- 🦋 Terakado J, Yoneyama T, Fujihara S (2006). *Shoot-applied polyamines suppress nodule formation in soybean (Glycine max)*. J Plant Physiol, 163:497-505.
- 🦋 Thomas G, Coutts G, Merrick M (2000). *The glnKamtB operon: a conserved gene pair in prokaryotes*. Trends Genet, 16:11-14
- 🦋 Tirichine L, Imaizumi-Anraku H, Yoshida S, Murakami Y, Madsen LH, Miwa H, Nakagawa T, Sandal N, Albrechtsen AS, Kawaguchi M, Downie A, Sato S, Tabata S, Kouchi H, Parniske M, Kawasaki S, Stougaard J (2006). *Deregulation of a Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development*. Nature, 441:1153-1156.
- 🦋 Tisi A, Federico R, Moreno S, Lucretti S, Moschou PN, Roubelakis-Angelakis KA, Angelini R, Cona A (2011). *Perturbation of polyamine catabolism can strongly affect root development and xylem differentiation*. Plant Physiol, 157:200-215.
- 🦋 Truchet GL, Dazzo FB (1982). *Morphogenesis of lucerne root nodules in the presence of combined nitrogen. Medicago sativa, histology and ultrastructure*. Planta, 154:352-360.
- 🦋 Tun NN, Santa-Catarina C, Begum T, Silveira V, Handro W (2006). *Polyamine induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in A. thaliana seedlings*. Plant Cell Physiol, 47:346-354.





U

- 🦋 Uhrig GR, Kenneth KS, Moorhead GBG (2009). *PII in higher plants: a modern role for an ancient protein*. Cell press, 14(9):505-511.



V

-  van Heeswijk WC, Wen D, Clancy P, Jaggi R, Ollis DL, Westerhoff HV, Vasudevan SG (2000). *The Escherichia coli signal transducers PII (GlnB) and GlnK form heterotrimers in vivo: fine tuning the nitrogen signal cascade*. Proc Natl Acad Sci USA, 97:3942–3947.
-  Vasudevan SG, Gedye C, Dixon NE, Cheah E, Carr PD, Suffolk PM, Jeffrey PD, Ollis DL (1994). *Escherichia coli PII protein: purification, crystallisation and oligomeric structure*. FEBS Lett., 337:255–258.
-  Vazquez-Bermudez MF, Herrero A, Flores E (2002). *2-Oxoglutarate increases the binding affinity of the NtcA (nitrogen control) transcription factor for the Synechococcus glnA promotor*. FEBS Lett, 512:71–74.



W

-  Wilkinson S, Davies WJ (2010). *Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community*. Plant Cell Environ, 33:510–525.
-  Wilson ID, Neill SJ, Hancock JT (2008). *Nitric oxide synthesis and signalling in plants*. Plant Cell Environ, 31:622–631.
-  Wisniewski JP, Brewin NJ (2000). *Construction of transgenic pea lines with modified expression of diamine oxidase and modified nodulation responses with exogenous putrescine*. Mol Plant-Microbe Interact, 13:922–928.
-  Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990). *Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archea, Bacteria and Eucarya*. Proc Natl Acad Sci USA, 87:4576–4579.

X

-  Xu Y, Cheah E, Carr PD, van Heeswijk WC, Westerhoff HV, Vasudevan SG, Ollis DL (1998). *GlnK, a pII-homologue: structure reveals ATP binding site and indicates how the T-loop may be involved in molecular recognition*. J Mol Biol, 282:149–165.
-  Xu Y, Glansdorff N, Labedan B (2006). *Bioinformatic analysis of an unusual gene-enzyme relationship in the arginine biosynthetic pathway among marine gamma proteobacteria: implications concerning the formation of N-acetylated intermediates in prokaryotes*. BMC genom, 7:4 doi:10.1186/1471-2164-7-4.

Y

-  Yamasaki H, Cohen MF (2006). *NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants?* Trends Plant Sci, 11:522–525.
-  Yang Y, Costa A, Leonhardt N, Siegel RS, Schroeder JI (2008). *Isolation of a strong Arabidopsis guard cell promoter and its potential as a research tool*. Plant Met, 4(6):1–15.

Z

-  Zeldler D, Zahringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzlerl P, Durner J (2004). *Innate immunity in Arabidopsis thaliana: lipopolysaccharides activate*

nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101:15811–15816.

■ ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

2-OG	2-ossoglutarato
ABA	Acido abscissico
ABC	<i>ATP Binding Cassette</i>
ACCasi	Acetil-CoA carbossilasi
ADC	Arginino-decarbossilasi
ADP	Adenosina difosfato
Agm	Agmatina
AIH	Agmatina imminoidrossilasi
Ala	Alanina
AMP	Adenosina monofosfato
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Acido aspartico
AT	Adenililtransferasi
ATP	Adenosina trifosfato
BC	Biotina Carbossilasi
BCCP	<i>Biotin Carboxyl Carrier Protein</i> , Proteina che trasporta la biotina
β-met	2-Mercaptoetanolo
BSA	Albumina da Siero Bovino
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i> , Virus del Mosaico del Cavolfiore
Cef	Cefotaxime
cGMP	Guanosina monofosfato ciclico
CPA	<i>N</i> -Carbamoyl putrescina amidoidrolasi
cPTIO	2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide
CPU	<i>Central Processor Unit</i>
CT	<i>CarboxylTransferase</i> , Transcarbossilasi
CTAB	Bromuro trimetilico cetilico dell'ammonio
C-ter	Carbossi-terminale
CTP	Citosina trifosfato

cTP	<i>Chloroplast Transit Peptide</i>
cv	<i>Cultivar</i>
DAF-2-DA	4,5-diaminofluoresceina-2-diacetato
DAO	Diammina ossidasi
DCMU	<i>3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea</i>
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DNA	Acido desossiribonucleico
dNTP	Deossinucleotide trifosfato
DraG	<i>Dinitrogenase Reductase Activating Glucohydrolase</i>
DraT	<i>Dinitrogenase Reductase ADP-ribosyl Transferase</i>
DTT	Ditiotreitolo
DW	<i>Dry Weight</i> , peso secco
EC	<i>Enzyme Classification</i>
EDTA	Etilen Diammono Tetra Acetato
ER	Reticolo Endoplasmatico
FAD	Flavina Adenina Dinucleotide
GABA	Acido γ -Aminobutirrico
GDH	Glutammato deidrogenasi
Gent	Gentamicina
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
Gln	Glutammina
Gly	Glicina
GOGAT	Glutammato Osso-Glutarato Ammino-Transferasi (o Glu sintasi)
GS	Glutamina sintetasi
Glu	Glutammato
GMP	Guanosina monofosfato
GTP	Guanosina trifosfato
HGT	<i>Horizontal Gene Transfer</i> , trasferimento genico orizzontale
His	Istidina
HPLC	Cromatografia liquida ad alta <i>performance</i> (o pressione)
LB	Luria-Bertani
LCA	<i>Last Common Ancestor</i> , ultimo comune antenore

LEC1	<i>Leafy Cotyledon 1</i>
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MES	Acido 2,4-N-MorpholinoEtansulfossido
Met	Metionina
MS	Murashige & Skoog
MscS	<i>Mechanosensitive Channel of Small Conductance</i>
MSO	<i>Methionine sulfoximine</i>
NADH	Nicotinammide Adenina Dinucleotide
NADPH	Nicotinammide Adenina Dinucleotide fosfato
NAG	<i>N-acetyl-L-glutamate</i>
NAGK	<i>N-acetyl-L-glutamate kinase</i>
NiNOR	<i>Nitrite:NO oxidoreductase</i>
NiR	Nitrito reduttasi
NOS	Ossido Nitrico Sintasi
NR	Nitrato reduttasi
N-ter	Ammino-terminale
OAA	Ossalacetato
OD	<i>Optical Density</i>
ODC	Ornitina decarbossilasi
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PA	Poliammine
PAO	Poliammina ossidasi
PAGE	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> , elettroforesi su gel di poliacrilammide
PamA	<i>PII Associated Membrane Protein A</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> , Reazione a catena della polimerasi
PEP	Fosfoenolpiruvato
Phe	Fenilalanina
P_i	Fosfato inorganico

PII-NG	<i>PII New Group</i>
PipX	<i>PII Interaction Protein X</i>
PMSF	Fenil-Metil-Sulfonil-Fluoruro
POT	Oligopeptidi protoni-dipendenti
PPM	<i>Mn²⁺/Mg²⁺-dependent protein phosphatase</i>
Put	Putrescina
PVP	Polyvinylpirrolydone
RB/LB	<i>Right/Left Border</i>
RFP	<i>Red Fluorescence Protein</i>
Rif	Rifampicina
RNA	Acido ribonucleico
rRNA	<i>Ribosomal RNA</i> , RNA ribosomiale
RWC	<i>Ratio Water Content</i>
SAM	S-adenosilmetionina
SAMDC	S-adenosilmetionina decarbossilasi
SDS	Sodio Dodecil Solfato
Ser	Serina
Spd	Spermidina
SPDS	Spermidina sintasi
Spm	Spermina
SPMS	Spermina sintasi
SSP	Proteine di riserva dei semi
TAE	Tris Acetato EDTA
TAG	Triacilgliceroli
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
T-DNA	DNA <i>Transfer</i> o di Trasferimento
TE	Tris EDTA
Thr	Treonina
T_m	<i>Melting Temperature</i> , Temperatura di fusione
Trp	Triptofano
TW	<i>Turgid Weight</i> , peso in piena turgidità
Tyr	Tirosina

TYR	<i>Tryptone - Yeast extract - Rhizobium</i>
UMP	Uridina monofosfato
UPGMA	<i>Unweighted-Pair-Group Method with Arithmetic Mean</i>
UT	Uridililtransferasi
UTP	Uridina trifosfato
UTR	<i>Untranslated Region</i> , Regione non tradotta
Val	Valina
VLCFA	<i>Very Long Chain Fatty Acid</i> , Acidi grassi a catena molto lunga
W (o FW)	<i>Fresh Weight</i> , peso fresco
<i>wt</i>	<i>wild type</i>
X-gluc	5-bromo-4-cloro-3-indol- β -glucuronide